



Infecção activa pelo Vírus Citomegálico Humano em doentes internados com sépsis numa Unidade de Cuidados Intensivos

Patrícia Alexandra Ferreira Ramos

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Microbiologia Médica
pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof. Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Vogais: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão e Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira

Março de 2014

Infecção activa pelo Vírus Citomegálico Humano em doentes internados com sépsis numa Unidade de Cuidados Intensivos

Patrícia Alexandra Ferreira Ramos

Dissertação para obtenção de Grau de Mestre em Microbiologia Médica
pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientadora: Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof.^a Doutora Ilda Maria Barros dos Santos Gomes Sanches

Arguente: Prof. Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Vogais: Prof. Doutor Paulo Jorge Pereira Cruz Paixão e Prof.^a Doutora Paula Alexandra Quintela Videira

Março de 2014

Infecção activa pelo vírus citomegálico humano em doentes internados com sépsis numa Unidade de Cuidados Intensivos

Indicação dos direitos de cópia em nome de Patrícia Alexandra Ferreira Ramos, aluna do Mestrado em Microbiologia Médica da FCT/UNL e da UNL.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Esta dissertação foi escrita de acordo com as regras anteriores ao novo acordo ortográfico.

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação

Reactivação do *Cytomegalovirus* em doentes com Sépsis numa Unidade de Cuidados Intensivos. Patrícia Ramos¹, Paulo Paixão^{1,2}, Cátia Piedade², Anabela Cunha², Otília Campos¹, André Casado³, Teresa Marques¹. 1-Universidade Nova de Lisboa, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, CEDOC, Lisboa. 2- Laboratório de Patologia Clínica, Hospital da Luz (LABCO), Lisboa. 3- Unidades de Cuidados Intensivos, Hospital da Luz, Lisboa.

Poster apresentado no **IV Congresso Nacional de Virologia – VIII Encontro da Sociedade Portuguesa de Virologia**, no Laboratório Nacional de Engenharia Civil, Lisboa, nos dias 25 e 26 de Outubro de 2013.

Agradecimentos

Queria começar por agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor Paulo Paixão, por me ter escolhido para participar neste projecto. Por todo o apoio e paciência em mim depositados e, principalmente, por acreditar em mim.

Aos meus pais e à minha irmã, pois sem eles nada poderia ter feito. Pelo apoio e amor incondicional que recebi todos os dias e que me deram força e coragem todos estes meses.

À Professora Doutora Paula Videira por todo a sua ajuda.

A toda a equipa do Departamento de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa. Obrigada pelo apoio, paciência, carinho, dedicação, e fundamentalmente, pela amizade. Entrei como aluna e sai como amiga. Obrigada por tudo.

À Andreia, por ter sido uma amiga e uma colega durante todos estes meses.

Ao Dr. André Casado por todo o apoio despendido.

À Cátia, pois sem ela não teria conseguido desenvolver este trabalho, e a toda a equipa do Hospital da Luz, que tornou este projecto possível.

Obrigada a todos. Sem vocês não teria conseguido desenvolver este trabalho. Obrigada por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditei. Obrigada pelas muitas horas ocupadas a tornar este projecto possível.

Agradeço a oportunidade que me foi dada para desenvolver um trabalho do qual me orgulho, porque ele não só cresceu comigo, como eu cresci devido a ele.

Resumo

Nos últimos tempos a reactivação do *Cytomegalovirus* (CMV) tem sido considerada um factor de agravamento nos doentes diagnosticados com sépsis das Unidades de Cuidados Intensivos (UCI).

Na presente investigação foram estudados 22 doentes diagnosticado com sépsis da UCI do Hospital da Luz, tendo a reactivação ocorrido em 8 (36,3%) dos doentes. A detecção do ADN do CMV foi realizada por duas técnicas de PCR em tempo real, uma *in house* e uma comercial (CMV HHV6,7,8 R-geneTM, bioMérieux), estando presente entre ambas as técnicas uma correlação positiva e significativa. Não foram encontradas relações entre a reactivação do CMV e o sexo ($p=1$), idade ($p=0,330$), tempo de permanência na UCI ($p=0,973$), duração da ventilação mecânica ($p=0,681$) e morte do doente ($p=1$). Contudo, os doentes com reactivação do CMV apresentaram um maior tempo de internamento no hospital desde a entrada da UCI até a alta hospitalar ou morte do doente ($p=0,025$). Foram comparadas as concentrações de nove citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , e INF γ) através de uma técnica de ELISA Multiplex (Q-PlexTM Array Chemiluminescent), nos doentes diagnosticados com sépsis tendo em conta a reactivação do CMV. Não foram encontradas diferenças nas concentrações das citocinas nos doentes com e sem reactivação. Também não foi encontrada uma relação entre carga viral e o agravamento do estado clínico do doente.

Apesar da baixa amostragem ter condicionado os resultados, o presente estudo confirmou que a reactivação do CMV está presente nos doentes da UCI diagnosticados com sépsis, prolongando o tempo de permanência no hospital destes doentes. Contudo, não foram encontrados perfis específicos de citocinas antes e durante a reactivação.

Abstract

In the last few years, Cytomegalovirus (CMV) reactivation as been considered an aggravation factor for septic patients in the ICU.

Eight of 22 septic patients from the ICU of Hospital da Luz had CMV reactivation. The CMV DNA was detect by two real time PCR techniques, an *in house* technique and a comercial technique (CMV HHV6,7,8 R-geneTM, bioMérieux), both with a good and significant correlation. Patients with and without CMV reactivation were not significantly different in parameters such as sex ($p=1$), age ($p=0,330$), length of stay in the ICU ($p=0,973$), length of mechanical ventilation ($p=0,681$), and death ($p=1$). However, patients with reactivation of CMV had an increase length of stay in the hospital, since ICU admission until death or leaving the hospital ($p=0,025$). We also compared the concentrations of nine cytokines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , e INF γ), obtained by a ELISA Multiplex (Q-PlexTM Array Chemiluminescent), between septic patients with and without CMV reactivation. However, there was no significant difference in the cytokines concentrations between septic patients with and without CMV. There were also no relation between viral load and the aggravation of the clinical state of patients.

Although a small sample could influence the results, the present study confirms that CMV reactivation is present in this group of UCI patients, causing a length of stay in the hospital. However, there were no specific cytokines profiles before and during the reactivation.

Índice

Elementos bibliográficos resultantes da dissertação	iv
Agradecimentos.....	vi
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução	1
<i>1.1. História do Cytomegalovirus</i>	<i>1</i>
<i>1.2. Introdução ao vírus</i>	<i>2</i>
<i>1.3. Constituição do Vírus.....</i>	<i>2</i>
<i>1.4. Ciclo de replicação, Latência e Reactivação do CMV</i>	<i>3</i>
1.4.1. Ciclo de Replicação	3
1.4.2. Tropismo celular.....	4
1.4.3. Fase de Latência	4
1.4.4. Processo de reativação	4
<i>1.5. Transmissão e Epidemiologia do vírus</i>	<i>5</i>
<i>1.6. Imunologia da infecção - Resposta imunitária face à infecção viral</i>	<i>7</i>
<i>1.7. Diagnóstico</i>	<i>8</i>
1.7.1. Histologia	9
1.7.2. Cultura Celular	9
1.7.3. Antigenémia	9
1.7.4. Detecção de ácidos Nucleicos – Ácido Desoxirribonucleico (ADN) e Ácido Ribonucleico (ARN).....	10
1.7.5. Serologia.....	11
<i>1.8. Tratamento</i>	<i>12</i>
<i>1.9. Principais grupos de risco para a infeção citomegálica</i>	<i>12</i>

1.9.1. Infecção na Grávida.....	13
1.9.2. Infecção nos indivíduos Imunocomprometidos.....	16
1.9.2.1. Indivíduos infectados pelo VIH.....	16
1.9.2.2. Indivíduos submetidos a transplantação	17
1.10. Infecção no indivíduo imunocompetente.....	19
1.11. Doentes Não-Imunocomprometidos das Unidades dos Cuidados Intensivos....	19
1.12. Reactivação do CMV nos indivíduos com sépsis internados nas Unidades de Cuidados Intensivos	20
1.13. Objectivos do estudo	22
2. Material e Métodos	23
2.1 Participantes do estudo.....	23
2.2. Recolha de dados	23
2.3. Amostras.....	24
2.3.1. Tratamento das amostras	24
2.4. Procedimento Experimental.....	25
2.4.1. Serologia.....	25
2.4.2. Reactivação do CMV	25
2.4.2.1. Extracção do ADN do CMV	26
2.4.2.2. Pesquisa de ADN de CMV nas amostras.....	26
2.4.2.2.1. Técnica de PCR em tempo real in house	27
2.4.2.2.2. Técnica de PCR em tempo real utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene®	28
2.4.3. Pesquisa de Citocinas	28
2.4.4. Tratamento de Dados.....	29
3. Resultados.....	30
3.1. Total de doentes incluídos no estudo	30
3.2. Dados gerais dos doentes do estudo	31
3.3. Análise da reactivação do CMV	33

3.4. Relação entre a gravidade da infecção e a carga viral.....	35
3.5. Comparação das duas técnicas de PCR em tempo real	36
3.5.1. Comparação qualitativa das duas técnicas	36
3.5.2. Comparação quantitativa das duas técnicas	37
3.5.3. Quantificação da AD169 utilizada como padrão na técnica de PCR em tempo real <i>in house</i>	38
3.5.4. Técnica de PCR em tempo real <i>in house</i> após ajustamento do valor do padrão	39
3.5.4.1. Sensibilidade da técnica <i>in house</i> após ajustamento.....	39
3.5.5. Comparação das técnicas de PCR em tempo real comercial e <i>in house</i> ajustada	40
3.6. Análise de Citocinas.....	41
3.6.1 Limites de sensibilidade e detecção	41
3.6.2. Análise das citocinas em doentes com processo inflamatório.....	42
3.6.2.1. Comparação dos Controlos e dos doentes com processo inflamatório... 42	
3.6.2.2. Evolução dos doentes com processo inflamatório.....	44
3.6.2.3. Concentração das citocinas e a avaliação do quadro clínico dos doentes com processo inflamatório ao longo das duas semanas de internamento.....	45
3.6.2.4. Relação entre as várias citocinas à entrada do estudo	47
3.6.3. Análise das Citocinas tendo em conta a reactivação do CMV	49
3.6.3.1. Concentração das Citocinas nos doentes com e sem reactivação do CMV à entrada do estudo	49
3.6.3.2. Concentração das Citocinas nos doentes com e sem reactivação do CMV após duas semanas de Internamento	50
3.6.3.3. Evolução da concentração de citocinas nos doentes com reactivação do CMV durante as duas semanas de internamento	51
3.6.3.4. Evolução dos doentes que reactivaram o CMV depois das duas semanas de internamento.....	52
3.6.3.5. Evolução da concentração de citocinas nos doentes sem reactivação do CMV durante as duas semanas de internamento	52
3.6.3.6. Concentração das citocinas tendo em conta o tempo de reactivação do CMV	54

3.6.3.6.1. Reactivação ao longo de uma semana.....	54
3.6.3.6.2. Reactivação ao longo de duas semanas.....	54
3.6.3.7. Concentração das citocinas e carga viral	55
4.Discussão de Resultados e Conclusão.....	56
5. Referências Bibliográficas.....	63
ANEXOS.....	81
<i>Anexo I – Consentimento Informado.....</i>	<i>82</i>
<i>Anexo II - Protocolo de Extração do ADN utilizando o Kit de Purificação JetQuick® Genomic DNA, Genomed, Löhne, Alemanha.....</i>	<i>84</i>
<i>Anexo III - Procedimento da PCR em Tempo Real utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene™ ref.:69-100</i>	<i>85</i>
<i>Anexo IV - Protocolo da técnica de ELISA Multiplex utilizando o Q-Plex™ Array Chemiluminescent</i>	<i>86</i>
<i>Anexo V - Dados colhidos durante o estudo</i>	<i>88</i>
<i>Anexo VI – Exemplo de resultados obtidos pelas técnicas de PCR em Tempo Real..</i>	<i>89</i>
<i>Anexo VII - Resultados obtidos pelas duas técnicas de PCR em tempo real.....</i>	<i>91</i>
<i>Anexo VIII – Valores da carga viral obtidos pela técnica in house ajustada.....</i>	<i>93</i>
<i>Anexo IX – Concentração das citocinas nos doentes com processo.....</i>	<i>94</i>
<i>inflamatório.....</i>	<i>94</i>
<i>Anexo X – Concentração das citocinas no grupo controlo</i>	
<i>Anexo XI - Concentrações das várias citocinas obtidas nas amostras de carga viral superior e inferior do doente</i>	<i>95</i>
<i>Anexo XI - Concentrações das várias citocinas obtidas nas amostras de carga viral superior e inferior do doente.....</i>	<i>96</i>

Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema da componente prática do trabalho.....	25
Figura 2 - Resultados da serologia dos doentes internados na UCI com diagnóstico de sépsis.....	30
Figura 3 - Distribuição da idade dos doentes em estudo.	31
Figura 4 - Representação gráfica do tempo de permanência de cada doente do estudo na UCI.	31
Figura 5 - Correlação entre as cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real.	37
Figura 6 - Representação gráfica das médias das cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real para as mesmas amostras.....	38
Figura 7 - Representação gráfica das médias das cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real in house, antes e depois ajustamento.....	39
Figura 8 - Correlação entre as cargas virais quantificadas pela técnica de PCR em tempo real in house ajustada e pelo PCR em tempo real CMV HH6,7,8 R-gene.	40
Figura 9 - Representação gráfica da diferença das médias das cargas virais obtidas pela técnica in house após ajustamento e técnica comercial.....	40
Figura 10 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas no grupo Controlo sem processo inflamatório e no grupo de doentes com processo inflamatório.	42
Figura 11 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos grupos: Controlo, Doentes com Reactivação e Doentes sem reactivação.....	44
Figura 12 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos doentes com processo inflamatório ao longo das duas semanas de internamento. .	45
Figura 13 - Representação gráfica das distribuições das concentrações nos Doentes com e sem reactivação à entrada no estudo.....	49
Figura 14 - Representação gráfica das distribuições das concentrações nos Doentes com e sem reactivação após duas semanas de internamento.....	50
Figura 15 - Representação gráfica da evolução das concentrações das citocinas nos doentes com reactivação durante as duas semanas de internamento.....	51

Figura 16 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos doentes sem reactivação à entrada do estudo e após duas semanas de internamento.	53
Figura 17 - Esquema das diluições seriadas do antígeno padrão.....	86

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Representação da média em dias das várias colheitas realizadas ao longo do internamento.	30
Tabela 2 - Comparação dos vários dados recolhidos nos doentes diagnosticados com sépsis, considerando os que sobreviveram e nos que faleceram.	32
Tabela 3 - Comparação do sistema de classificação APACHE II nos doentes diagnosticados com sépsis com falência de órgãos.....	32
Tabela 4 - Identificação da primeira colheita positiva no doente e o seu dia recolha. ...	33
Tabela 5 - Comparação das características do estado clínico dos doentes tendo em conta a reactivação do CMV.	34
Tabela 6 - Comparação das características do estado clínico dos doentes tendo em conta a carga viral do doente.....	35
Tabela 7 – Estudo da gravidade da doença tendo em conta o pico da carga viral atingido.	36
Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas de PCR em tempo real.	36
Tabela 9 - Limites de detecção e de quantificação da técnica de leitura da concentração das citocinas.....	41
Tabela 10 - Comparação das concentrações das citocinas nos grupos Controlo e Doentes com processo inflamatório.	42
Tabela 11 - Comparação das concentrações das citocinas nos grupos Controlo e Doentes com reactivação (11A) e sem reactivação (11B).....	43
Tabela 12 - Estudo da evolução dos doentes com processo inflamatório durante as duas primeiras semanas de internamento.....	44
Tabela 13 - Distribuição da concentração das citocinas dos doentes com processo inflamatório, tendo em conta a evolução do quadro clínico do doente.	46
Tabela 14 - Concentração das citocinas à entrada (14A) e após duas semanas de internamento (14B) nos doentes que sobreviveram e nos doentes que faleceram. .	47
Tabela 15 - Correlação entre as concentrações das citocinas à entrada do estudo.	48
Tabela 16 - Concentração das médias dos doentes com e sem reactivação à entrada do estudo.....	49

Tabela 17 - Concentração das médias dos doentes com e sem reactivação após duas semanas de internamento.....	50
Tabela 18 - Evolução da concentração das citocinas após as duas semanas de internamento.	51
Tabela 19 - Evolução da concentração das médias até alta hospitalar ou morte do doente dos doentes com reactivação do CMV.	52
Tabela 20 - Evolução da concentração das médias dos doentes sem reactivação do CMV.....	53
Tabela 21 - Relação da concentração das citocinas entre uma amostra negativa e uma positiva para o CMV com uma semana de intervalo.....	54
Tabela 22 - Relação da concentração das citocinas entre uma amostra negativa e uma positiva com duas semanas de intervalo.....	55
Tabela 23 - Relação entre a carga viral e a concentração das citocinas.	55

Abreviaturas

µm - micrograma

kb - kilobases

% - percentagem

pg - picograma

ml – mililitro

µl - microlitro

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

EDTA K3 - Ácido Etilenodiamino tetra-acético tripotássico

1. Introdução

1.1. História do *Cytomegalovirus*

Foi em 1881 que os efeitos do *Cytomegalovirus* foram observados pela primeira vez por H. Ribbert, que encontrou, nos rins de um nado-morto por sífilis, células grandes com corpos homogêneos dentro do núcleo designando-os de inclusões. Vinte e três anos mais tarde, A. Jesionek e B. Kiolemenoglou descreveram inclusões semelhantes encontradas em células do fígado, rins e pulmões de um nado-morto de oito meses, relacionando-as com protozoários. Mais tarde, em 1907, a equipa de Ribbert fez uma nova descoberta deste tipo de células nas glândulas parótidas de quatro crianças de um grupo de trinta, com idades compreendidas entre os dois meses e os dois anos (147).

Em 1921, Goodpasture e Talbot registaram a semelhança entre as células descritas por Ribbert e as encontradas em lesões na pele provocadas pela Varicela, colocando a possibilidade de o causador de tais efeitos nas células ser um agente semelhante. No mesmo ano, outro investigador de nome Lipsghuetz também verificou a parecença com células de humanos infectados com o vírus *Herpes simplex* (74, 147). VonGlahn e Pappenheimer relacionaram as conclusões de Lipsghuetz não só com a possibilidade das alterações celulares serem produzidas por vírus e não por protozoários, como estas inclusões serem originadas por um grupo específico de vírus, mais tarde conhecido como *Herpesvirus* (184).

Uma década mais tarde, estas células com típicas inclusões intranucleares foram encontradas em casos de infecção congénita que apresentavam um quadro clínico muito específico, nomeadamente, calcificações intracerebrais e hepatoesplenomegália, tendo sido sugerido por Wyatt o nome de Doença Generalizada de Inclusões Citomegálicas (do inglês *Generalized Citomegalic Inclusion Disease* - CID). Em 1950, a equipa de Smith e Vellios reportou novos casos de doença com a presença destas células, designando estes casos como infecção viral das glândulas salivares ou Doença de Inclusões Citomegálicas. O vírus foi isolado pela primeira vez em 1950 mas foi em 1957 que Weller propôs o nome de *Cytomegalovirus* (74).

1.2. Introdução ao vírus

O Vírus Citomegálico ou *Cytomegalovirus* (CMV) é um vírus da família *Herpesviridae*, sub-família *Beta-Herpesvirinae* e género *Cytomegalovirus*, e é também conhecido como *Herpesvirus Humano 5* (HHV-5) (180).

A designação do vírus deve-se ao efeito citopático característico que provoca nas células infectadas, que atingem 25 a 35µm com o aumento do volume citoplasmático e com a presença de inclusões intranucleares basófilas rodeadas por um halo, conferindo-lhes um aspecto de “olho de coruja” (16).

1.3. Constituição do Vírus

O CMV é estruturalmente semelhante a outros membros da família *Herpesviridae*, possuindo uma cápside icosaédrica de 162 capsómeros proteicos que envolvem e protegem o material genético viral (65). A camada mais externa a envolver a cápside denomina-se de invólucro, sendo constituído por uma bicamada lipídica da qual fazem parte as glicoproteínas, muitas delas responsáveis pela resposta imune do hospedeiro. Estas moléculas permitem a ligação aos receptores celulares do hospedeiro e posterior entrada do vírus nas células e são também o principal alvo dos anticorpos que neutralizam o vírus. Existem várias glicoproteínas, como a glicoproteína B (gB) e a glicoproteína H (gH) (93, 177), sendo através das glicoproteínas que se determina o genótipo do vírus (185).

Entre a cápside e o invólucro viral está localizado o tegumento, um compartimento de proteínas virais de função estrutural e não estrutural. As primeiras desempenham um importante papel na separação das partículas do vírus durante a sua entrada na célula hospedeira, bem como na construção e libertação do novo vírus da célula. As restantes proteínas têm como função proteger o vírus da resposta imune do hospedeiro face à infecção (117), sendo o CMV o vírus da família *Herpesviridae* que expressa o maior número de genes destinados a alterar a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro (116).

O genoma viral consiste numa molécula de ADN linear em dupla cadeia com um tamanho de 235 a 240 kb, sendo o CMV o maior vírus da família *Herpesviridae*, codificando para mais de 165 genes (27). A molécula genómica do CMV é constituída por dois domínios, um segmento de genoma longo (do inglês *long chain* – *L*) e um segmento de genoma curto (do inglês *short chain* – *S*), ambos constituídos por uma região única central, *UL* e *US*,

respectivamente. Estas regiões *UL* e *US* estão flanqueadas por segmentos constituídos por zonas de repetição invertidas (do inglês *tandem repeat –TR*) que residem nas pontas exteriores do genoma do vírus, *TRL* e *TRS* respectivamente, bem como nas zonas de intersecção das duas regiões, *IRL* e *IRS*. Consequentemente o genoma do CMV tem uma organização de *TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS* (122). A designação dos genes baseia-se no segmento que ocupam no genoma do vírus, por exemplo o gene *UL55* que codifica para a gB está localizado na posição 55 da região única do segmento de genoma longo (13, 87).

1.4. Ciclo de replicação, Latência e Reactivação do CMV

1.4.1. Ciclo de Replicação

O CMV ao infectar um hospedeiro invade as suas células de modo a replicar o genoma viral para produção de novos vírus. Para tal, tem que ultrapassar a barreira que protege as células hospedeiras, a membrana citoplasmática, sendo necessária a interacção entre os receptores celulares membranares e os componentes do vírus. Esta fusão é mediada pelas glicoproteínas virais, nomeadamente a gB (57). Após a sua entrada, o vírus inicia a infecção libertando para o interior das células as proteínas do tegumento, necessárias para a regulação das funções celulares do hospedeiro, e as proteínas da cápside que envolvem o ADN viral. O genoma do vírus é libertado no núcleo da célula, sendo posteriormente replicado pela maquinaria celular, originando novos vírus que irão infectar as células vizinhas (170).

Da replicação do CMV, bem como de todos os vírus da família *Herpesviridae*, resultam genes que são expressos em três fases sequenciais distintas, a fase imediatamente precoce (do inglês *immediatly-early - IE*), fase precoce (do inglês *early - E*) e fase tardia (do inglês *late - L*). Dos genes expressos na fase *IE* resultam antígenos ou proteínas *IE* ou alfa (α), que surgem no núcleo das células infectadas uma a três horas após a infecção, sendo responsáveis não só pelo início da infecção, como pelo controlo do ambiente da célula hospedeira vigiando a expressão dos genes celulares e virais. Os antígenos que resultam da expressão dos genes da fase intermédia, antígenos ou proteínas *E* ou beta (β), são detectados no citoplasma ou na membrana aproximadamente três horas após a infecção e controlam a criação de novos vírus ao produzirem as enzimas essenciais para a replicação do genoma viral, como a ADN polimerase codificada pelo gene *UL54*. Por fim, os

antígenos cujos genes são expressos na última fase, antígenos ou proteínas *L* ou gama (γ), estão presentes no núcleo e no citoplasma da célula, seis a vinte e quatro horas após a infecção e farão parte da cápside e do invólucro viral, auxiliando na montagem das partículas virais e na libertação do novo vírus (87, 163, 164). Em todas as fases do ciclo replicativo do vírus as proteínas que são produzidas estimulam o início da fase seguinte (160).

1.4.2. Tropismo celular

O CMV é caracterizado pelo seu alargado tropismo para os tecidos celulares (45). Pode manifestar doença em grande parte dos órgãos e tecidos, como consequência dos diversos tipos de células que tem capacidade para infectar durante a fase aguda da infecção, tais como monócitos, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, células musculares lisas, granulócitos, células neuronais e hepatócitos (146, 158, 159, 176).

1.4.3. Fase de Latência

Após a entrada na célula hospedeira e à semelhança de outros *Herpesvirus*, o CMV pode prosseguir para uma infecção activa com produção de novos vírus, ou pode estabelecer um estado de latência com a expressão de um reduzido número de genes virais, sem causar qualquer dano na célula (12, 69, 156). O mecanismo pelo qual este processo de latência ocorre é ainda desconhecido. Pode iniciar-se logo após a entrada do vírus na célula, antes de qualquer expressão de genes virais, como também pode ocorrer com a interrupção da expressão sequencial dos genes *IE*, *E* e *L* ou, por fim, com a expressão de genes virais associados ao processo de latência, em vez de estarem relacionados com a infecção produtiva viral (29). No entanto, todo este processo de latência não ocorre em qualquer célula que o CMV infecta, apenas em certas células da linhagem mielóide, tais como nos monócitos do sangue periférico e nas células progenitoras hematopoiéticas (17, 114, 119) e nas células endoteliais (84), sendo os monócitos o maior reservatório celular do vírus (169).

1.4.4. Processo de reactivação

A reactivação do CMV pode ocorrer aquando uma imunossupressão relacionada com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) ou com o transplante de órgãos (79, 156), como

pode também resultar de um estímulo que as células com CMV latente recebem. Este estímulo pode ser consequência de um aumento de citocinas em circulação devido a um processo inflamatório (sépsis, queimaduras, traumas, cirurgias) (83).

Já foi descrito anteriormente que a expressão dos genes *IE* é necessária para uma replicação completa do CMV nas células (139, 155). A expressão destes genes no hospedeiro é controlada por um forte complexo promotor (do inglês *Major Immediate-early Promote – MIEP*), junto ao qual se encontram sequências alvo de uma molécula designada de factor nuclear kappa B (do inglês *Nuclear Factor kappa B - NF-κB*) (81). O NF-κB é um complexo proteico envolvido na regulação da resposta imune celular e está presente em quase todos os tipos de células contribuindo, por exemplo, para a produção de citocinas que desempenham um importante papel na resposta inflamatória. Ao ligar-se a sequências específicas no genoma, inicia a transcrição de genes alvo que se localizam após as sequências, funcionando como factor de transcrição desses genes (10, 102). Em células não activadas, o complexo está inactivado, pois encontra-se ligado a uma molécula inibitória designada de Inibidor do NF-κB (I-κB). Mas se a célula é exposta a diversos estímulos para a produção de citocinas, por exemplo, ocorre a separação destas duas moléculas através da degradação da molécula inibitória, deixando o complexo proteico NF-κB livre e activado (167). Nas células infectadas com o CMV em fase latente, o complexo NF-κB activado liga-se às sequências alvo situadas na região do promotor do gene *IE* (79) e através da activação do complexo *MIEP* é possível a expressão dos genes *IE*, e consequentemente a expressão dos genes *E* e *L*, ocorrendo a reactivação do vírus levando à produção de novos vírus (40).

1.5. Transmissão e Epidemiologia do vírus

A transmissão do CMV pode ocorrer como resultado de uma infecção primária, quando o indivíduo contacta com o vírus pela primeira vez, ou como consequência de uma infecção recorrente, quer seja por reactivação do vírus ou por reinfeção do indivíduo quando é infectado por uma estirpe de CMV diferente da qual é portador (85).

O primeiro contacto com o vírus ocorre habitualmente nos primeiros anos de vida, podendo o CMV ser transmitido de mãe para filho durante a gravidez ou aleitamento, ou então pelo contacto directo com indivíduos infectados (adultos ou outras crianças) através

de secreções que contém o vírus como saliva, urina ou lágrimas. Pode também ser transmitido por contacto sexual, transfusão sanguínea e por transplantação de órgãos sólidos ou de medula óssea (171).

A transmissão materna pode ocorrer via placentária (transmissão intrauterina), aquando do desenvolvimento de uma infecção materna primária de CMV durante a gravidez, ou por via perinatal, através do parto ou do aleitamento, sendo esta última a forma mais comum de transmissão do vírus no primeiro ano de vida (144, 162). As crianças infectadas libertam uma quantidade significativa do vírus durante um longo período de tempo (meses a anos) após a infecção (111). São as principais transmissoras do vírus não só a outras crianças mas também a adultos, incluindo não apenas familiares mas todos os que lidam com estas crianças, principalmente os trabalhadores das creches e infantários (86). Estudos revelaram um padrão genético idêntico de CMV excretado por várias crianças e trabalhadores do mesmo infantário ou mães, o que sugere uma fonte comum de infecção, demonstrando também que estes profissionais são indivíduos em maior de infecção pelo CMV (1, 5). Mas o grupo mais preocupante são as mães ou as trabalhadoras das creches ou infantários que estão grávidas e são seronegativas para o vírus (162).

Porém, em alguns países, nomeadamente no norte da América e no norte da Europa, a seropositividade regista um aumento significativo em indivíduos na fase da adolescência, o que poderá ser consequência da transmissão do vírus pelo contacto sexual (36). A transmissão pode também ocorrer na transplantação de órgãos sólidos ou de medula óssea, sendo os doentes transplantados considerados doentes de risco, pois o CMV é uma das principais causas de infecção viral após um transplante (38).

A seroprevalência do CMV na população humana varia entre 30 a 90%, embora em algumas regiões se observe uma prevalência de 100% (8). Esta não uniformidade da distribuição deve-se ao facto da prevalência depender de factores geográficos e económico-sociais, mas também de práticas de higiene nos infantários (124, 130). Em Portugal, de acordo com um estudo decorrido em 2002 e 2003, verificou-se que a prevalência é de 77% nos adultos, sendo que a infecção primária pelo CMV é mais frequente nos primeiros 2 a 4 anos de idade, aumentando a prevalência proporcionalmente com a idade dos indivíduos (107).

1.6. Imunologia da infecção - Resposta imunitária face à infecção viral

O CMV desencadeia uma resposta imune por parte de todo o sistema imunitário do hospedeiro, sendo considerado um potente imunogénio (37). A primeira defesa é da responsabilidade da imunidade inata do hospedeiro, sendo activada aquando a entrada do vírus na célula (148). Nesta fase, os receptores celulares Toll-like (do inglês *Toll-like receptor* - TLR), nomeadamente o TLR2, interagem com os antígenos gB e gH do CMV (33) iniciando um conjunto sequencial de processos que resultam na activação de factores de transcrição e de citocinas, como o NF- κ B e Interferão (IFN)- α/β , respectivamente (15, 22, 125). São recrutadas para o local da infecção células do sistema inato – macrófagos, Células Apresentadoras de Antígenos (do inglês *Antigen Presenting Cells* - APC) e células *Natural Killer* (NK) – que formam uma primeira defesa antiviral e que também é necessária para o desenvolvimento de uma resposta imune mais duradoura e específica, isto é, uma resposta adaptativa para o CMV (148). As APC, como o próprio nome indica, apresentam os antígenos virais às células T do sistema imune adaptativo, através do processamento proteolítico destes antígenos em pequenos péptidos que são apresentados pelas moléculas MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex* - complexo principal de histocompatibilidade) (92). As células T dividem-se principalmente em células T citotóxicas (Tc) e células T helper (Th), respectivamente, CD8 positivas e CD4 positivas, que desenvolvem respostas direccionadas para as proteínas codificadas pelo genoma do vírus nas diferentes fases da sua replicação, quer sejam proteínas da cápside, do tegumento, glicoproteínas ou proteínas envolvidas na evasão imune (37).

No indivíduo infectado, o aparecimento das células T CD4 positivas precede o das células T CD8 positivas, sendo que as primeiras aparecem em média 7 dias após a detecção do ADN do CMV e as segundas emergem em média 14 dias depois do aparecimento das células T CD4 positivas (55). Estes dois tipos de células T estimulam a produção de citocinas com efeitos antivirais, tais como, o factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1beta (IL-1 β) e INF- γ . Contudo as células T CD8 positivas têm como principal função a lise das células infectadas e as células T CD4 positivas não só são as responsáveis pela regulação da função das células T citotóxicas como auxiliam as células B a secretar anticorpos com elevada especificidade para os antígenos virais que contribuem para a neutralização do vírus (70, 154). Daí que as células T CD8 sejam as células com função

dominante no decorrer de uma infecção activa do vírus, e as células T CD4 sejam importantes em manter o equilíbrio entre a resposta celular e humoral e a replicação viral no decorrer de uma infecção persistente (153).

Mas embora a infecção seja controlada por uma forte resposta das células T, o vírus não é eliminado do hospedeiro, permanecendo em células específicas num estado latente com possíveis episódios de reactivação (148). Aqui é muito importante uma resposta humoral pré-existente, pois os anticorpos produzidos pelos linfócitos B protegem o hospedeiro de uma reactivação do vírus impedindo a sua disseminação e consequente propagação da infecção (37). O principal alvo destes anticorpos neutralizantes consiste na glicoproteína do invólucro, a gB (46, 128). Após uma infecção viral primária nos indivíduos imunocompetentes são detectados no soro do hospedeiro anticorpos específicos para o CMV. São primeiro produzidas as Imunoglobulinas anti-CMV classe M (IgM anti-CMV) que persistem 3 a 4 meses no soro do indivíduo infectado, seguidas das Imunoglobulinas anti-CMV classe G (IgG anti-CMV) que persistem para toda a vida (41, 187). A detecção destes anticorpos é muito importante para o diagnóstico e determinação de estadios de uma infecção, como será descrito mais adiante.

1.7. Diagnóstico

Um teste de diagnóstico para o CMV deverá ter as seguintes características para ser utilizado na rotina: ter uma elevada sensibilidade para permitir uma detecção precoce, nomeadamente em indivíduos com risco de desenvolver doença; deve ter capacidade de quantificação da carga viral, nomeadamente para monitorizar a terapêutica; tem de ser rápido a obter os resultados, caso seja necessário iniciar ou alterar a terapêutica; e, por fim, deve ter um elevado grau de reprodutibilidade. Até recentemente os testes laboratoriais falhavam nas requisições de rapidez e reprodutibilidade, mas com o progresso da ciência, nomeadamente com o desenvolvimento de métodos de detecção e quantificação antigénica e de métodos de amplificação molecular, todos os requisitos ficaram preenchidos (14). A infecção activa do CMV pode ser detectada pela presença do vírus nos vários fluidos biológicos, que são posteriormente analisados por múltiplos métodos laboratoriais (99), que serão descritos de seguida.

1.7.1. Histologia

O CMV pode ser detectado em biópsias ou citologias através da visualização de inclusões intra-nucleares características do vírus (olhos de coruja) (112). Mas para além de ser uma técnica com baixa sensibilidade, pela dificuldade, por vezes, de diferenciação de inclusões virais de não virais, requer métodos de colheita de amostra invasivos (76).

1.7.2. Cultura Celular

O CMV tem sido tradicionalmente isolado em culturas de fibroblastos onde é possível observar o seu efeito citopático característico nas células infectadas. Este método convencional pode ser utilizado nos diversos fluidos biológicos, contudo é considerado um processo demorado, apresentando resultados ao fim de uma a três semanas, sendo um resultado negativo só confirmado após vinte e um dias de cultura. De forma a diminuir o tempo de detecção do vírus, modificou-se o método convencional de cultura celular para uma nova técnica designada de “Shell Vial”, em que o vírus é isolado com uma centrifugação numa monocamada de fibroblastos. O crescimento viral é medido através da detecção dos antígenos virais. Neste processo um resultado positivo é confirmado pela presença de fluorescência nas células infectadas (150). Esta técnica permite obter resultados em dezasseis horas, reduzindo assim o tempo de detecção em comparação com o método anterior (59).

1.7.3. Antigenémia

Esta técnica consiste num método quantitativo rápido que determina directamente nos leucócitos a presença da proteína viral pp65, codificada pelo gene *UL83* do CMV, sendo o resultado expresso como o número de leucócitos infectados por CMV por número de células analisadas (175). É uma técnica que requer pessoal qualificado, visto que os resultados irão depender da observação de cada operador, e apenas se podem utilizar amostras de sangue, ao contrário das técnicas descritas anteriormente que podem utilizar outros fluidos orgânicos, condicionando o resultado em doentes com diminuição do número de células polimorfonucleares (140). Contudo é um método mais sensível e com resultados mais rápidos face às técnicas descritas anteriormente, sendo útil não só para o diagnóstico da doença por CMV, como também é vantajoso para monitorizar o percurso da

infecção, sendo que os valores de antigenémia vão diminuindo à medida que as manifestações clínicas são resolvidas (47, 123).

1.7.4. Detecção de ácidos Nucleicos – Ácido Desoxirribonucleico (ADN) e Ácido Ribonucleico (ARN)

O uso de sondas de ácidos nucleicos e técnicas de amplificação, como a Reacção em Cadeia da Polimerase (do inglês *Polimerase Chain Reaction* - PCR) tornaram-se muito importantes para o diagnóstico de infecções virais (64, 76).

As sondas de ácidos nucleicos detectam genes virais em amostras clínicas, como é o caso da tradicional técnica de hibridação *in situ*, útil para o estudo nas biópsias da distribuição da infecção por CMV nos tecidos (90). Também têm sido utilizadas técnicas de hibridação directa em amostras clínicas após extracção dos ácidos nucleicos, sendo dois exemplos, o “*CMV hybrid capture assay*” e “*Branched-DNA capture assay*”. Estas técnicas de hibridação não amplificam o ADN do CMV, mas sim o sinal do ADN alvo, sendo a intensidade do sinal proporcional à quantidade de ADN de CMV presente na amostra em estudo (173, 178). A sensibilidade da técnica é superior quando comparada com a das culturas celulares e semelhante à encontrada na Antigenémia (113), embora a quantificação seja mais objectiva que a da técnica da Antigenémia (178).

Contudo a técnica de PCR têm despertado um maior interesse na comunidade científica, complementando, e em alguns casos substituindo, as técnicas até agora utilizadas (188). Existem técnicas desenvolvidas por cada laboratório – técnicas *in house* – e técnicas comerciais, sendo que a diferença consiste nos equipamentos utilizados, no procedimento da técnica, ou mesmo na sequência alvo do ADN do CMV que se pretende estudar (140). Mas em todas o conceito da técnica é igual, sendo um método de amplificação *in vitro* dos ácidos nucleicos, extraídos de uma amostra de qualquer fluido biológico, num processo cíclico que se inicia com a fase de desnaturação da cadeia dupla de ADN permitindo a ligação dos *primers* (sequência simples de bases nucleotídicas) à sua sequência alvo para iniciar a amplificação dessa sequência. A leitura da amplificação é realizada separadamente numa diferente técnica, como por exemplo *Southern Blot*, através de um gel de electroferese (151). Visto que o ADN de um vírus em fase latente pode ser detectado por métodos de PCR em amostras clínicas, os resultados de um PCR CMV qualitativo

devem ser relacionados com o quadro clínico do doente e com outros testes laboratoriais (188). A técnica de PCR é a técnica apresentada mais sensível à detecção do vírus, conseguindo detectar mais precocemente que o teste da Antigenémia uma infecção por CMV (140), contudo apresenta um valor preditivo positivo mais baixo podendo reconhecer uma infecção que não seja clinicamente significativa (166).

A técnica de PCR em tempo real veio revolucionar as técnicas convencionais de PCR, pois conjuga na mesma técnica a amplificação de ADN com a detecção do sinal, sendo uma técnica de sensibilidade semelhante mas mais rápida e de menor risco de contaminação quando comparada com o método convencional (48). É possível com esta técnica quantificar o ADN viral pela comparação com padrões de concentração conhecida, através de uma curva padrão permitindo identificar o número de cópias do CMV por unidade de volume de amostra (188).

A detecção de transcritos de ARN (ARNm) de CMV na célula é um bom indicador de existência de replicação viral, sendo fundamental para determinar a presença de uma infecção activa por CMV (188). A técnica para detectar o ARNm de CMV designa-se de “*Nucleic Acid Sequence-Based Amplification*” (NASBA), sendo um exemplo o modelo de detecção do ARNm do antígeno da fase tardia pp67, que pode ser utilizado para monitorizar a progressão de infecções por CMV, bem como os efeitos da terapia antiviral, com resultados semelhantes aos detectados na técnica da Antigenémia (11).

1.7.5. Serologia

Os métodos serológicos podem ser utilizados em estudos epidemiológicos através da prevalência dos anticorpos IgG específicos para o CMV (De la Hoz et al., 2002), ou para determinar se uma infecção é recente ou antiga pela presença de anticorpos IgM e IgG específicos para o CMV (99). Esta última informação é necessária quando se trata, por exemplo, de um transplante em que é importante definir o risco de infecção do doente, ou em casos de infecções que ocorram durante a gravidez (64).

Uma infecção primária pode ser detectada pela seroconversão dos anticorpos IgG, ou seja, pelo desenvolvimento de anticorpos em concentrações detectáveis no soro, ou pela detecção de IgM e IgG. No entanto, a confirmação de uma infecção primária apenas com a presença da IgM pode não apresentar um resultado viável, pois não só também está

presente durante a reactivação do vírus (63), como a sua presença pode não ser verdadeira, mas antes condicionada pela existência de auto-anticorpos ou reacções cruzadas com outros *Herpesvirus*, podendo originar falsos positivos (41). Para além disso, os valores de IgM podem manter-se detectáveis por longos períodos de tempo após a exposição ao vírus. Quando se detecta uma infecção activa por CMV pela presença de ambos os anticorpos, deve-se acompanhar estes testes pela determinação da avidéz dos anticorpos IgG, para perceber se se trata de uma nova infecção (63). Se o resultado obtido demonstrar uma baixa avidéz é indicativo de uma infecção recente, enquanto que uma alta avidéz é representativa de uma infecção passada (100, 120).

1.8. Tratamento

A terapêutica antiviral para o CMV é utilizada na sua grande maioria para o tratamento e prevenção da infecção por CMV nos imunocomprometidos, isto porque nos indivíduos imunocompetentes a infecção é resolvida naturalmente, não sendo necessário recorrer a terapêutica específica (109). O Ganciclovir é um inibidor competitivo da ADN polimerase viral, e a sua activação depende de proteínas codificadas pelo vírus (58). Embora seja considerado o antiviral de primeira linha utilizado no tratamento de infecção por CMV (9), está associado a efeitos graves de toxicidade aquando da sua toma prolongada e o aparecimento de resistências ao antiviral (109). Outros dois antivirais aprovados para o tratamento do CMV são o Foscarnet e o Cidofovir, sendo alternativas ao tratamento com Ganciclovir quando na presença de mutações no alvo (43). Por fim, outro antiviral aprovado designa-se de Fomivirsen, cujo alvo consiste no ARNm do *MIEP* do CMV, sendo utilizado para o tratamento dos pacientes com retinite (99).

1.9. Principais grupos de risco para a infecção citomegálica

A infecção por CMV pode causar consequências graves em diferentes grupos de indivíduos, como grávidas e imunodeprimidos, incluindo estes últimos sobretudo os indivíduos infectados com o VIH e os doentes transplantados. Estes grupos considerados de risco exigem uma vigilância mais cuidada e, como tal, será descrita a infecção pelo vírus com maior pormenor em cada um destes grupos.

1.9.1. Infecção na Grávida

Durante a gravidez, o sistema imune da grávida fica suprimido, contribuindo para o aumento da incidência da infecção por CMV e consequentemente para o aumento do risco de transmissão do vírus ao embrião em desenvolvimento (130). Uma junção de todos os estudos publicados até 2006, demonstrou uma taxa de incidência a nível mundial de 0,64% (91). Em Portugal, segundo um estudo realizado entre 2003 e 2004, a infecção congénita por CMV foi encontrada em 1,05% dos nascimentos ocorridos nesse período (132).

A infecção congénita pode resultar como consequência de uma infecção primária materna, quando a grávida contacta pela primeira vez com o vírus no decorrer da gravidez, ou de uma infecção recorrente, aquando a reactivação do vírus ou a reinfeção com uma nova estirpe (144). Quando uma infecção primária de CMV ocorre durante a gravidez, a probabilidade de transmissão do vírus para o feto é 40 a 50% (127, 161). Porém, se a infecção resulta da reactivação do vírus durante a gravidez (10 a 30% das gestações), existe um menor risco de transmissão ao feto (0,5 a 2%) (2, 110, 127) devido à presença de anticorpos maternos pré-existentes, específicos para o CMV que protegem parcialmente o feto da transmissão intra-uterina (52). Contudo, uma reinfeção com uma nova estirpe pode também resultar numa transmissão ao feto, mesmo que a grávida tenha esta imunidade pré-existente (18). Cerca de 90% das crianças com infecção congénita por CMV não exibem quaisquer sintomas aquando o seu nascimento, enquanto que as restantes 10% das crianças desenvolvem manifestações clínicas que incluem calcificações intracranianas, hepatoesplenomegália, trombocitopénia e alterações hepáticas, geralmente a icterícia e o aumento das transaminases, podendo conduzir à morte do recém-nascido (6). Para além de sequelas ao nível do neurodesenvolvimento (28), as crianças sintomáticas têm maior risco de perda de audição (22-65%) comparando com as crianças assintomáticas (6-23%), embora em ambos os casos a surdez sensorineural possa estar presente aquando o nascimento da criança, ou ser progressiva (53).

A transmissão do CMV pode também ocorrer durante o parto, pelo contacto com as secreções vaginais, ou através da ingestão de leite materno, designando-se em ambos os casos de infecção perinatal. Estudos demonstram taxas consideráveis de excreção do vírus pelo leite materno, consequência da reactivação materna do CMV durante ou após a

gravidez, sendo um maior risco de infecção sintomática nos recém-nascidos prematuros (67, 181).

Sendo uma infecção primária materna do CMV um maior risco de transmissão da infecção congénita ao feto, o seu diagnóstico é muito importante (144). O melhor diagnóstico de uma infecção primária consiste na seroconversão das IgG anti-CMV das grávidas; contudo, se as mulheres não forem rastreadas antes da concepção, a seroconversão não é observada o que dificulta o diagnóstico (120, 168). A opção seria a detecção das IgM anti-CMV, sendo esta presença um indício de uma infecção primária materna, mas pelas razões acima descritas (ver Diagnóstico-Serologia) não se deve basear o diagnóstico apenas por este resultado. A análise da avidéz das IgG anti-CMV veio tornar completa a análise da presença de IgM e de IgG anti-CMV, sendo um teste de avidéz baixo indicativo de uma infecção recente, o que poderá representar um risco de transmissão do CMV para o feto (12). Logo, a confirmação laboratorial de uma infecção materna consiste na presença de IgM e IgG anti-CMV, e de uma avidéz baixa de IgG anti-CMV.

Os factores de maior relevância no diagnóstico pré-natal são a presença de uma infecção materna, diagnosticada de acordo com os critérios acima definidos, e/ou a presença de alterações no feto aquando a realização da ecografia obstétrica, ou mais recentemente, da ressonância magnética cerebral fetal (144, 168). A partir destes exames médicos podem ser detectadas alterações como um atraso de crescimento intra-uterino ou a presença de calcificações intracranianas, sugestivos de uma infecção congénita por CMV no feto (145), embora apenas naqueles com infecção grave pelo vírus, podendo os restantes passar despercebidos nestes exames (66). Em resumo, estando confirmada uma infecção materna por CMV por serologia, e/ou existindo alterações imagiológicas como as anteriormente referidas, é necessário determinar se ocorreu transmissão do vírus ao feto.

O método de referência consiste na pesquisa do vírus a partir da 21ª semana no líquido amniótico (colhido por amniocentese), através da cultura do vírus ou de métodos moleculares, como a PCR (101), sendo que se for realizada antes da 21ª semana pode apresentar uma maior taxa de falsos negativos (149). Se em ambas as técnicas os resultados forem negativos, a probabilidade de transmissão do vírus para o feto é reduzida,

o que pode ajudar os pais na decisão de terminar a gravidez aquando uma infecção primária no decorrer da gestação (101).

Para confirmar uma infecção congénita durante a gravidez, para investigar casos de suspeita de infecção materna durante a gestação, e para detectar casos de infecção congénita assintomática, deve determinar-se a presença do vírus na urina ou na saliva do recém-nascido até às duas a três primeiras semanas após o nascimento (7, 144). A detecção de infecção congénita é importante pois permite a prevenção dos recém-nascidos em risco de desenvolver sequelas, principalmente os assintomáticos à nascença, permitindo a sua colocação em programas de vigilância para detectar sequelas da infecção por CMV, como é o caso da surdez sensorineural e de atrasos psicomotores (7). Após este período, a presença de CMV no recém-nascido pode ser indicativo de infecção adquirida após o nascimento (185). A detecção do CMV pode ser realizada por métodos de cultura do vírus ou por métodos moleculares, apresentando o segundo método maior sensibilidade que o primeiro, mas em ambos a presença de elevadas cargas virais está associada a infecções congénitas sintomáticas (185).

Após estas três primeiras semanas de vida o diagnóstico de infecção congénita, pela pesquisa do vírus na urina ou saliva, pode apresentar falsos positivos, sendo que estes resultados correspondem a infecções de CMV adquiridas durante o parto ou através do leite materno (7). Recentemente têm sido utilizados os cartões de *Guthrie* para o diagnóstico de infecção congénita após as primeiras semanas de vida. Todas as crianças entre o segundo e o sexto dia de vida realizam este teste para pesquisa de doenças metabólicas (42). A vantagem de se usar estes cartões para a pesquisa do vírus é a de que podem ser utilizados meses após a sua colheita, apresentando mesmo assim uma boa sensibilidade e especificidade para o CMV aquando a sua pesquisa por PCR, sendo possível um diagnóstico tardio de infecção congénita (7, 62). A presença de cargas virais elevadas, tanto em recém-nascidos sintomáticos como em assintomáticos, é um risco de desenvolver surdez sensorineural (19, 186). A detecção das crianças em risco numa fase tão precoce permite uma melhor monitorização e intervenção (19).

Quando ocorre a reactivação do vírus durante a gravidez, a mãe pode transmitir o CMV ao recém-nascido pelo aleitamento, daí a importância do controlo da seroconversão dos

anticorpos maternos, nomeadamente das IgG anti-CMV, e a detecção de ADN de CMV no leite materno, para detectar as crianças em risco, nomeadamente as crianças que nascem prematuramente (68).

1.9.2. Infecção nos indivíduos Imunocomprometidos

A infecção por CMV é frequentemente uma infecção oportunista e por vezes grave em indivíduos imunocomprometidos (indivíduos infectados com o VIH ou indivíduos transplantados com medicação imunossupressora) devido ao debilitado sistema imune (37).

1.9.2.1. Indivíduos infectados pelo VIH

Cerca de 95% dos indivíduos VIH positivos estão infectados com CMV (165). Como já foi descrito anteriormente, após a infecção primária por CMV, o vírus fica em estado latente com possíveis episódios de reactivação que são controlados pelo sistema imunitário. Em indivíduos com uma deficiente função das células T, a replicação do vírus após a reactivação não é controlada, podendo ter consequências graves. Portanto, indivíduos com o vírus do VIH num estado de imunossupressão avançado – Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA) – são indivíduos em risco de doença por CMV (157). A baixa contagem de células T CD4 positivas pode conduzir à presença de infecções oportunistas pelo CMV, nomeadamente ao nível do aparelho gastrointestinal (esofagite e colite) e do sistema nervoso central, sendo esta última menos frequente (94, 13). Mas a manifestação clínica mais comum é a retinite caracterizada por uma inflamação ocular, sendo a grande responsável pela perda de visão nesta população de doentes (89). Com o desenvolvimento da Terapêutica Anti-Retroviral de Elevada Potência (do inglês *Highly Active Antiretroviral Treatment* – HAART), a incidência e a gravidade da retinite por CMV nestes indivíduos diminuiu consideravelmente (89, 165) através da reposição dos níveis de células T CD4 positivas, permitindo ao indivíduo controlar a reactivação de uma infecção latente (179). Contudo uma nova patologia tem sido associada a este esquema terapêutico, designada de “*immune recovery vitritis*”, que é já reconhecida como causa de lesão na visão de pacientes com SIDA (179). Este quadro clínico de vitrite está associado a doentes com uma retinite passada, e com uma boa resposta à HAART, podendo ser consequência da reacção imunológica ao CMV (89).

Em doentes com VIH, a serologia é necessária apenas para determinar a presença das IgG anti-CMV, de forma a revelar os doentes em risco de uma reactivação. Para o diagnóstico de infecção por CMV nestes doentes, recorre-se principalmente à sintomatologia clínica. A detecção do vírus é essencialmente feita em casos de suspeita de infecção no sistema nervoso central, sendo a pesquisa feita no líquido cefalorraquidiano, e em casos de pneumonia, sendo a pesquisa realizada nos lavados bronco-alveolares. A detecção do vírus é também importante na monitorização do tratamento destes doentes (94).

1.9.2.2. Indivíduos submetidos a transplantação

A transplantação de órgãos sólidos ou de medula óssea é um recurso terapêutico para muitas patologias podendo, no entanto, surgir graves complicações como o aparecimento de infecções virais, que poderá desencadear consequências graves no doente (38). Embora a vigilância para estas infecções tenha aumentado e melhorado ao longo dos anos, o CMV continua a ser o vírus mais significativo após a transplantação (50, 78). Esta incidência da infecção por CMV nos doentes submetidos a transplantação pode ser consequência do tipo ou da intensidade da terapia imunossupressora a que são sujeitos, do próprio órgão transplantado, sendo que uns órgãos são mais susceptíveis à infecção que outros, ou mesmo de co-infecções com outros *Herpesvirus*, como o *Hespervirus Humano 6* (HHV6) (78). A infecção pode ocorrer como consequência de (a) uma infecção primária, quando o receptor do transplante é seronegativo para o vírus e o seu dador seropositivo, (b) da reactivação do vírus, sendo o receptor do transplante seropositivo para o vírus, (c) da reinfeção do vírus, quando o doente receptor é infectado por uma nova estirpe do vírus proveniente do órgão do dador (25).

No caso de se tratar de um transplante de um órgão sólido, o maior factor de risco de aquisição de doença ocorre aquando uma infecção primária no doente receptor (44, 78), visto que este não possui qualquer resposta imune protectora específica para o CMV possível de controlar a replicação (134, 135). Nos casos de transplante de medula óssea, o maior factor de risco de infecção por CMV resulta da reactivação do vírus (118), com maior incidência (80%) quando comparado com a ocorrência de infecção primária (30%) (106).

A infecção por CMV nos doentes receptores compreende uma grande variedade de manifestações clínicas, desde infecção assintomática a doença por CMV grave ou mesmo letal. Em grande parte dos casos de doença por CMV, a sintomatologia associada engloba um quadro de febre e fadiga, podendo também incluir mialgias e neutropénia, e mais tarde doenças como a coriorretinite e a colite. Estas consequências de efeito directo podem ser mais específicas, dependendo do órgão transplantado, como é o exemplo de hepatite, pancreatite ou pneumonia, em casos de transplante de fígado, pâncreas ou pulmão, respectivamente (96, 134). Consequências mais graves da infecção por CMV, designadas de manifestações de efeito indirecto, resultam da interacção do vírus com o sistema imune do hospedeiro (49) podendo não só originar lesões no órgão transplantado e, consequentemente, provocar a rejeição do mesmo, como também aumenta a susceptibilidade do hospedeiro a infecções oportunistas (bactérias, fungos ou outros vírus) (137).

De modo a evitar estes efeitos resultantes da infecção por CMV, os clínicos recorrem a um protocolo de vigilância prematura, designado de regime *pre-emptive*, onde é realizada uma monitorização regular do doente para detecção precoce da replicação do CMV, através de métodos de antigenémia ou de detecção de ácidos nucleicos. Ao primeiro sinal de presença de replicação viral é aplicada uma terapia antiviral de forma a prevenir a doença, sendo necessária uma boa coordenação entre o doente e o médico para realização frequente de análises e a existência de um padrão universal de início de terapia (78). No entanto, outro regime é também utilizado pelos clínicos, onde é feita a avaliação do risco de infecção do doente recorrendo a métodos serológicos, nomeadamente a pesquisa de IgG anti-CMV, de forma a determinar o estado serológico do dador e do receptor. Este regime de profilaxia é encaminhado a todos os doentes em risco de infecção do CMV durante a transplantação, independente da presença ou não do vírus (78; 141). Mas com este regime de profilaxia, a doença tardia, por consequência da infecção primária do vírus, tem ganho relevância nomeadamente por ocorrer após a sua descontinuação (25). Em doentes transplantados de fígado, o surgimento de doença tardia por CMV, como consequência de infecção primária, ocorre 3 meses após uma completa profilaxia antiviral (4).

O regime *pre-emptive*, ao contrário da profilaxia, diminui o uso e a toxicidade dos antivirais nos doentes em risco, visto que estes podem não desenvolver doença, contudo

um doente com virémia positiva pode também não manifestar qualquer sintomatologia relacionada com a doença por CMV, apresentando-se como falso positivo (77, 78). Métodos laboratoriais, nomeadamente a quantificação do ADN do CMV e a antigenémia, são úteis na identificação dos doentes infectados com o vírus, nomeadamente os doentes em regime *pre-emptive*, mas também são importantes na monitorização e na determinação da eficácia do tratamento antiviral (154).

1.10. Infecção no indivíduo imunocompetente

Ao contrário dos casos acima mencionados, uma infecção primária pelo CMV é normalmente assintomática em indivíduos imunocompetentes e raramente causa complicações nestes indivíduos saudáveis. Contudo, certas infecções primárias podem desenvolver no hospedeiro uma sintomatologia muito semelhante a uma síndrome mononucleósica, clinicamente indistinguível de uma infecção primária pelo vírus *Epstein-Barr*, e com uma sintomatologia de mal-estar, febre, mialgia, linfadenopatia e hepatoesplenomegália, podendo estes sintomas persistir durante semanas (176, 187). As consequências clínicas do CMV, ao serem afectados órgãos ou tecidos, são raras mas graves, podendo ocorrer casos de artralgia, artrite, colite ulcerativa, pneumonia, hepatite, meningite, miocardite, anemia hemolítica ou trombocitopenia (56).

1.11. Doentes Não-Imunocomprometidos das Unidades dos Cuidados Intensivos

Nos últimos tempos os doentes das Unidades dos Cuidados Intensivos (UCI) têm sido reconhecidos como doentes em risco de infecção pelo CMV (131). São considerados doentes não-imunocomprometidos, pois embora possuam algum grau de imunossupressão transitória, não recorrem a qualquer terapia imunossupressora durante o internamento nem são seropositivos para o VIH (21). São múltiplas as razões médicas e cirúrgicas que originam estes internamentos, envolvendo pacientes com enfartes do miocárdio, pneumonias, queimaduras, traumatismos, sépsis, entre outras. A situação clínica destes doentes pode ser agravada por complicações que ocorrem durante o internamento que podem prolongar o tempo de hospitalização, como infecções nosocomiais (50, 51). Estes doentes manifestam durante o internamento uma sintomatologia consistente com uma imunossupressão do sistema imune, sendo um exemplo a possível reactivação de infecções latentes, como o CMV (50, 82). Acredita-se que a infecção por este vírus nos doentes das

UCI resulte da reactivação do mesmo em vez de uma infecção primária, dado que os doentes seronegativos não desenvolvem infecção quando comparando com os doentes seropositivos (20).

A detecção do CMV neste grupo de doentes não é uma análise de rotina. Porém, nos últimos anos, o interesse clínico por esta área aumentou ao verificar-se, nestes pacientes, uma prevalência da infeção por CMV de 0 a 35% (83), sendo que nos estudos realizados até à data a prevalência da reactivação não encontra um consenso, pois as várias equipas de investigação utilizam não só diferentes desenhos de estudo, como dimensões inconstantes, diferentes populações e técnicas de pesquisa do vírus com maior ou menor sensibilidade (73). Mas, no geral, todos relacionam a presença do vírus com consequências graves no internamento, como o prolongamento do tempo de hospitalização, o aumento da duração da ventilação mecânica, o aumento da susceptibilidade a infecções nosocomiais, e, em alguns casos, a morte do paciente (88).

Os doentes internados na UCI com diagnóstico de sépsis são doentes associados a infecções recorrentes por CMV. Dado o interesse em estudar a reactivação do vírus em doentes da UCI, escolheu-se este grupo de indivíduos como população alvo do trabalho de investigação, sendo a principal razão porque serão descritos mais detalhadamente.

1.12. Reactivação do CMV nos indivíduos com sépsis internados nas Unidades de Cuidados Intensivos

Sépsis é uma condição clínica definida pela presença de uma infecção – consequência da invasão de um fluido orgânico ou tecido estéril por um microrganismo patogénico – e por uma inflamação sistémica designada de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SRIS) (172). A sépsis é assim caracterizada por uma resposta sistémica programada mas não específica do sistema imune do hospedeiro face à infecção que ameaça a hemóstase (97). Quando a evolução da doença leva a um quadro clínico de sépsis com o envolvimento de órgãos, o doente está perante uma sépsis grave. Para além da falência de um ou múltiplos órgãos, o doente também apresenta evidências de hipotensão arterial ou hipoperfusão (97, 172). A sépsis pode ainda evoluir para um estado ainda mais grave com falência circulatória – hipotensão arterial refractária – designando este estado clínico como choque séptico. As bactérias são as grandes responsáveis por este quadro clínico de sépsis,

sendo as mais comuns as de coloração Gram-negativa, como as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp., e algumas de Gram-positiva, nomeadamente *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. (97, 172).

As bactérias são reconhecidas pelos receptores celulares TLR, estimulando as células da imunidade inata a secretar IFN- α que ajuda a diferenciação das células T helper. Na fase inicial de sépsis é necessária uma resposta pró-inflamatória, sendo as células T diferenciadas em células Th1 libertando citocinas primárias como o TNF- α e a IL-1 (75). Estes mediadores não só são responsáveis por regular a migração das células do sistema imune para o local da infecção, como também permitem a libertação de outras citocinas, como a Interleucina 6 (IL-6) e a Interleucina 8 (IL-8), funcionando todas em conjunto para manter o equilíbrio durante o processo inflamatório (32). Contudo a libertação e a persistência de elevadas concentrações destes mediadores inflamatórios podem contribuir para lesões nos órgãos, agravando o quadro clínico do doente (10, 138). Com esta progressão da sépsis em que a resposta imune está sobrecarregada de moléculas pro-inflamatórias, o sistema desenvolve uma resposta anti-inflamatória alterando o perfil da resposta das células T helper para uma prevalência de Th2, de forma a equilibrar a resposta imune (97). Estas células produzem citocinas anti-inflamatórias, nomeadamente a Interleucina 10 (IL-10), que tem como principal função a de inibir a produção das citocinas pro-inflamatórias causando a disfunção de células como macrófagos e células T (10, 97).

Porém este equilíbrio celular pode ser afectado aquando uma excessiva resposta pro-inflamatória no local da infecção, sucedendo-se uma acumulação não só de componentes tóxicos, libertados pelas células do sistema imune de forma a eliminar os microrganismos, como também de fibrina, visto que as citocinas pro-inflamatórias são responsáveis pela inibição das moléculas anticoagulantes. Desta situação podem resultar lesões nos tecidos ou órgãos, bem como alteração do rendimento cardíaco, da pressão sanguínea e da distribuição do oxigénio, conduzindo à falência de um tecido ou órgão (97, 172) À medida que a doença se mantém inalterada mais órgãos são envolvidos, o que agrava o quadro clínico do doente, podendo causar a sua morte (32).

Nos últimos anos têm-se expandido estudos que relacionam não só o internamento destes indivíduos com diagnóstico de sépsis e a reactivação do CMV, o que acontece em 20 a

50% destes doentes, como também estudam o possível envolvimento do vírus no desenvolvimento do quadro clínico do paciente durante a sua hospitalização (131). Ao ocorrer uma forte resposta pró-inflamatória, seguida de uma anti-inflamatória, desenvolve-se um ambiente propício à reactivação do CMV nos doentes com sépsis, visto que os mediadores inflamatórios libertados pelas células do sistema imune são responsáveis pela activação do complexo NF- κ B e consequente activação do promotor do gene IE do CMV (35), tal como já foi referido anteriormente.

Foram efectuados estudos de forma a determinar quais as moléculas inflamatórias responsáveis pela reactivação do CMV, utilizando um modelo de estudo muito semelhante ao CMV humano, o CMV murino (MCMV). Desta forma, concluíram que tanto o Lipopolissacárido das Bactérias Gram-Negativas (108), como o TNF- α e a IL-1 β (35, 80), e a IL-6 (143) conseguem reactivar o vírus da sua forma latente, através da observação da expressão dos genes virais na presença destes mediadores inflamatórios.

Estudos realizados em doentes humanos permitiram a comparação das concentrações de IL-6, IL-1 e TNF- α obtidas durante o internamento dos doentes com sépsis que reactivaram o CMV, com as dos doentes hospitalizados com sépsis sem reactivação (98). Concluíram que as concentrações de TNF- α encontravam-se elevadas nos doentes que reactivaram o vírus, podendo o aumento destes mediadores estar relacionado com a reactivação do vírus pela estimulação da região do promotor do CMV. Contudo a concentração de TNF- α aumentava proporcionalmente com o valor da carga viral, podendo ser o aumento de concentração uma consequência da infecção activa pelo CMV, ou seja, um efeito da resposta do sistema imune ao próprio vírus.

1.13. Objectivos do estudo

O principal objectivo deste estudo consiste na determinação da reactivação do CMV em doentes internados na Unidade de Cuidados Intensivos com diagnóstico de sépsis, e se essa reactivação está relacionada com a evolução do quadro clínico do doente ao longo do seu internamento no hospital. Simultaneamente, procedeu-se à comparação de duas técnicas de PCR em tempo real utilizadas para detectar a reactivação, bem como à análise da concentração de mediadores inflamatórios de cada doente durante a sua permanência no hospital testando a sua relação com a reactivação do CMV e com a evolução do doente.

2. Material e Métodos

2.1 Participantes do estudo

A investigação decorreu entre Outubro de 2012 e Julho de 2013 no Hospital da Luz, em Lisboa, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética do Hospital da Luz. Cada paciente do estudo assinou o Consentimento Informado autorizando a participação das suas amostras no ensaio (Anexo I). Todos os pacientes que deram entrada na Unidade de Cuidados Intensivos no Hospital da Luz com diagnóstico de sépsis foram incluídos no estudo como doentes com processo inflamatório. Foram excluídos doentes imunodeprimidos, doentes sob tratamento de quimioterapia e doentes submetidos a qualquer terapia anti-viral que pudesse influenciar as conclusões do estudo. O acompanhamento de cada doente ocorreu durante o seu período de internamento hospitalar, desde a entrada na UCI até alta hospitalar, ou em alguns casos, morte do doente.

Os resultados obtidos pelo doseamento das citocinas no grupo de doentes diagnosticados com sépsis foram comparados com os de um grupo controlo de indivíduos saudáveis sem processo inflamatório e sem doença coronária significativa. Este grupo controlo está inserido num projecto que decorreu simultaneamente com esta investigação (projecto “Infecção activa pelo vírus citomegálico humano nos síndromos coronários agudos”) e onde se procedeu ao doseamento das citocinas sob as mesmas condições.

Os médicos não tiveram qualquer acesso aos resultados, sendo que estes foram utilizados apenas para fins de investigação.

2.2. Recolha de dados

A cada doente da UCI foi atribuído um número de 1 a 27 na altura da inclusão no estudo. Fez-se a recolha dos dados de cada doente para, posteriormente, serem relacionados estatisticamente com os resultados obtidos no decorrer da investigação, tais como:

1. Idade e Género do doente;

2. Classificação APACHE II (do inglês *Acute Physiology and Chronic Health disease Classification System II*) à entrada do doente no estudo – Este sistema de classificação da gravidade da doença permite identificar os indivíduos em risco de um mau prognóstico após a sua admissão na UCI, através da idade, historial clínico, determinantes fisiológicos, pressão arterial, entre outros (95);
3. Data da admissão e saída da UCI – estes dados permitiram determinar, para cada doente, o tempo de permanência na UCI;
4. Data de admissão na UCI e alta hospitalar – com estes dados obteve-se, para cada doente, o tempo de permanência no hospital;
5. Necessidade de ventilação mecânica – considerou-se positiva sempre que se recorreu, durante o internamento do doente, a esta ventilação assistida;
6. Duração da ventilação mecânica – foi determinado o tempo de duração da ventilação de cada doente;
7. Alta hospitalar ou morte do doente.

2.3. Amostras

As amostras de soro e de sangue total foram recolhidas, respectivamente, em Tubos secos (com sílica) e em EDTA K3. Cada vez que o doente realizava uma colheita a pedido do médico, para análise dos parâmetros bioquímicos, essa amostra era utilizada para monitorização da reactivação do CMV e para leitura dos mediadores inflamatórios.

As amostras foram depois encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas, Lisboa, Portugal, e congeladas a -70°C em tubos próprios de congelação correctamente identificados.

2.3.1. Tratamento das amostras

As amostras de sangue total em tubos secos foram centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm para obtenção de soro. Ambas as amostras colhidas – soro e sangue total – foram guardadas a 4°C até à sua deslocação ao Laboratório de Microbiologia, não excedendo as 72 horas após a colheita.

2.4. Procedimento Experimental

O procedimento experimental está esquematizado na Figura 1. Para o doseamento das citocinas foram utilizadas, para além das amostras dos doentes em estudo, as amostras do grupo controlo já descrito anteriormente.

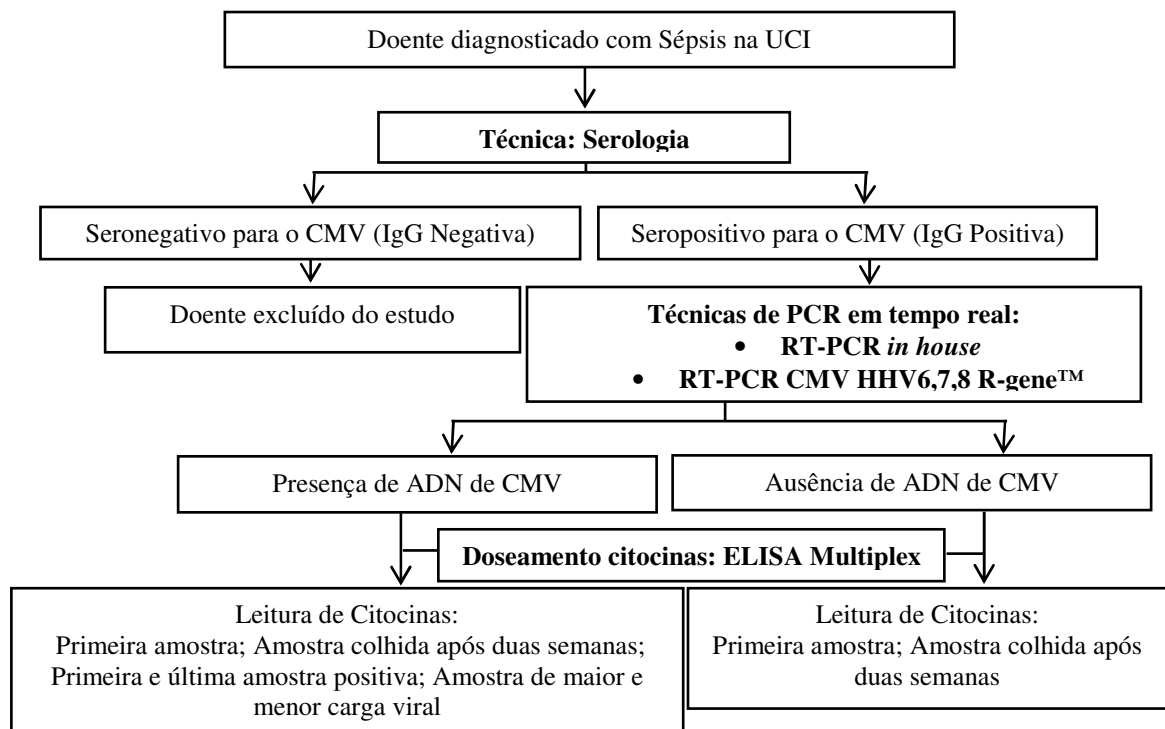


Figura 1 - Esquema da componente prática do trabalho

2.4.1. Serologia

Permite determinar se o doente alguma vez esteve em contacto com o vírus, de forma a indicar, caso o ADN do CMV esteja presente no indivíduo, que a infecção é consequência de uma reactivação. A determinação das IgG anti-CMV foi efetuada pelo Kit IgG CMV- técnica “*Enzyme Linked Fluorescent Assay*” (ELFA), realizada no equipamento “Vidas” (BioMérieux). Os resultados inferiores ao valor de 4U/mL foram considerados como negativos e os superiores a 6U/mL foram definidos como positivos (estas determinações foram efetuadas no Laboratório Central da LabCo – Lisboa).

2.4.2. Reactivação do CMV

A infecção por CMV foi considerada positiva aquando a presença de ADN do vírus nas amostras de sangue total colhidas em EDTA K3. Se o ADN de CMV estiver presente

em pelo menos uma das amostras colhidas por doente, o resultado será positivo, ou seja, o doente em estudo reactivou o vírus durante o seu internamento. Para analisar a presença do vírus, deve-se primeiro fazer a extracção do ADN do CMV das amostras e depois analisar por métodos de biologia molecular (PCR em tempo real).

2.4.2.1. Extracção do ADN do CMV

Para extracção do ADN viral no sangue total colhido em EDTA K3, foi utilizado o Kit de Purificação JetQuick® Genomic DNA, Genomed, Löhne, Alemanha. A técnica foi elaborada de acordo com as instruções do fabricante (ver Anexo II), tendo em conta que se utilizou 200 µl de sangue total. Esta técnica consiste na obtenção de ADN genómico através das várias fases de tratamento da amostra:

1. Preparação do Lisado – Esta fase compreende a minimização das possíveis interferências aquando a aquisição de ADN puro, através dos seguintes processos:
 - a. Desnaturação das proteínas com um tampão de lise celular;
 - b. Digestão enzimática das proteínas desnaturas e libertação do ADN genómico das proteínas a ele ligadas com *Genomed* Protease (20mg/ml);
 - c. Digestão do ARN residual com a Rnase A (20mg/ml);
2. Fixação do ADN genómico na membrana de sílica – Esta fase consiste na passagem do lisado por uma coluna com membranas de sílica permitindo a ligação do ácido nucleico à sílica.
3. Purificação do ADN genómico – Nesta fase são utilizados dois tampões de lavagens para eliminar da coluna as impurezas e outros contaminantes presentes no lisado;
4. Eluição do ADN genómico – Este processo engloba a passagem de 10 mM Tris-HCl pH=8,5, uma solução que liberta o ADN genómico da membrana de sílica.

Ao fim destes processos obtém-se ADN genómico que deverá ser armazenado a -20°C.

2.4.2.2. Pesquisa de ADN de CMV nas amostras

A pesquisa de ADN de CMV foi efectuada recorrendo a duas técnicas de PCR em tempo real: uma técnica *in house*, e uma utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene™,

ref.:69-100, Argene, Biomérieux, MArCy-l'Etoile, França. Em ambas as técnicas o número de cópias de ADN de CMV por ml de sangue total foi determinada tendo em conta os valores de CT (*Thresold cycle*), que representam o ciclo a partir do qual é detectada fluorescência na amostra, correspondendo assim ao ponto onde a curva de amplificação da amostra atinge a base de referência de fluorescência emitida (71). Os resultados foram apresentados como o número de cópias de ADN de CMV por ml de sangue total.

2.4.2.2.1. Técnica de PCR em tempo real *in house*

Esta técnica consiste na determinação da presença de ADN de CMV pela pesquisa do gene *UL83* (133). As amostras foram realizadas em duplicado na mesma corrida, sendo o procedimento a utilizar o seguinte:

1. Proceder à realização de uma mistura total de reacção de 25 µl, sendo que 20 µl correspondem à mix desta técnica e 5 µl ao volume da amostra. Nesta reacção utiliza-se os seguintes reagentes para constituição da mix (tendo em conta que a concentração de stock dos primers e da sonda é de 100 µM): (a) TaqMan Universal PCR Master Mix (2x), (b) Primers CMV (100 µM) (CMV F: 5'-CCC TCG GGC AAG CTC TTT-3' e CMV R: 5'CAG GTC CTC TTC CAC GTC AGA-3'), (c) Sonda CMV (10 µM) – 5'-TGC ACG TCA CGC TGG-3' marcada em 5' com 6-*carboxy-fluorescein* como repórter e em 3' com *minor groove com oquancher*, e (d) água até perfazer os 20 µl de volume total.
2. Para a realização da curva padrão utiliza-se a AD169 quantificada por um teste comercial (Artus CMV RG PCR KIT, Rotor-Gene 3000, Corbett Research). O ponto de referência de maior concentração na curva corresponde a uma diluição de 1:100 da AD169, com uma concentração final de 165000 cópias de ADN de CMV/ml, sendo os dois pontos seguintes utilizados diluições seriadas de 1:10 desta diluição.
3. Como controlo interno de cada amostra utiliza-se 2 µl da primeira diluição de 1:10 da AD169. Se ocorrer inibição pela amostra, não ocorrerá qualquer amplificação do controlo interno;
4. O aparelho utilizado para a realização do PCR em tempo real *in house* é o ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems), com um ciclo de amplificação de: (a) 1 ciclo

durante 2 minutos a 50°C, (b) 1 ciclo durante 10 minutos a 95°C, (c) 50 ciclos durante 15 segundos a 95°C, e (d) Fase de leitura durante 1 minuto a 60°C. A técnica tem uma sensibilidade de 200 cópias/ml.

2.4.2.2.2. Técnica de PCR em tempo real utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene®

Esta técnica de PCR em tempo real utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene ref.:69-100®, Argene, Biomérieux, MArCy-l'Etoile, França, detecta o ADN de CMV pela pesquisa do gene *UL83*. O seu limite de detecção é de 50 cópias/ml. A técnica foi elaborada de acordo com o protocolo do fabricante (Anexo III), com uma modificação, a de que não foi realizado controlo interno, pois já tinha sido realizado na técnica de PCR em tempo real *in house* primeiro.

2.4.3. Pesquisa de Citocinas

A técnica utilizada para a pesquisa de citocinas é uma ELISA Multiplex, utilizando o Q-Plex™ Array Chemiluminescent, Quansys, Logan, Utah (Anexo IV). Esta técnica consiste num ensaio de ELISA Multiplex em que, ao contrário de uma ELISA convencional onde se estuda apenas um tipo de analito, na técnica Multiplex podem-se estudar vários analitos a partir da mesma amostra e na mesma placa. Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizada uma placa de 96 poços, cada um com 10 *sptos*, sendo que 9 *sptos* representam individualmente uma citocina a estudar – IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α, e INFγ – e o restante representa o controlo. Quando a amostra é adicionada ao poço, as citocinas presentes ligam-se aos anticorpos de captura nos *sptos* específicos para cada uma, ficando fixas na placa. Posteriormente é adicionado o anticorpo de detecção que se liga às citocinas capturadas na fase anterior. Estes anticorpos possuem moléculas de biotina que se ligam à Estreptovidina associada a uma enzima. Ao colocar o substrato é desencadeada uma reacção luminosa que apenas ocorre quando as citocinas estão presentes, sendo possível medir através da sua intensidade. É esta intensidade luminosa que é lida e convertida no *software*, aquando comparação com o padrão utilizado, para poderem ser analisadas as concentrações de citocinas presentes na amostra.

Recorreu-se a esta técnica para analisar e comparar as concentrações das citocinas à entrada e na segunda semana de internamento tendo em conta o processo inflamatório e,

seguidamente, a reactivação. Nos doentes com mais de uma amostra em estudo, foi escolhido o período de duas semanas por não só ser aquele em que grande parte dos doentes realizou uma colheita, exceptuando os casos em que ocorreu alta hospitalar ou morte do doente antes das duas semanas de internamento, como também por ser a colheita realizada momentos antes da reactivação, tendo em conta a média da colheita da primeira amostra positiva para o CMV. No caso dos doentes com reactivação, foi estudada a possível relação entre carga viral e concentração das citocinas, tendo sido realizadas nestes doentes, leituras de citocinas nas amostras com maior e menor carga viral, na última amostra positiva e na última negativa podendo, em alguns casos, coincidirem algumas variáveis.

2.4.4. Tratamento de Dados

Os dados obtidos ao longo do estudo foram analisados recorrendo ao *software* SPSS (versão 16.0). Foram utilizados métodos estatísticos descritivos (média e desvio padrão) para analisar os vários dados ao longo da investigação. Para o tratamento destes dados, recorreu-se a testes estatísticos consoante as variáveis a estudar (136). O teste de Kolmogorov-Smirnov e de Shapiro Wilk, principalmente este último por se tratar de uma amostra de estudo pequena, determinam se a variável em estudo segue uma distribuição normal, de forma a encaminhar o estudo para o uso de um teste paramétrico (distribuição normal) ou não paramétrico (distribuição não normal) para comparar duas ou mais variáveis. Os testes paramétricos utilizados foram o Teste t de student, para comparar uma variável quantitativa e uma variável qualitativa; o Teste t para amostras emparelhadas, para duas variáveis quantitativas relacionadas; a Correlação de Pearson, para determinar a relação de duas variáveis quantitativas. Os testes não paramétricos utilizados foram o Teste U de Mann-Whitney, para comparar uma variável qualitativa e uma variável quantitativa; o Teste Exacto de Fisher, para comparar duas variáveis qualitativas; o Teste de Wilcoxon para comparar variáveis quantitativas relacionadas; e a Correlação de Spearman, para determinar a relação de duas variáveis quantitativas. Diferenças entre as variáveis estudadas foram consideradas significativas aquando um valor de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Total de doentes incluídos no estudo

No decorrer dos meses do estudo deram entrada na UCI do Hospital da Luz 27 doentes com diagnóstico de sépsis. Destes doentes três foram excluídos: um por não ter assinado o consentimento informado para a participação das suas amostras no estudo, outro por se tratar de um doente imunodeprimido e outro por estar sob corticoterapia.

Dos 24 restantes, apenas dois apresentaram uma serologia negativa para o CMV (IgG anti-CMV negativa) não podendo as suas amostras serem utilizadas para o decorrer da investigação (Figura 2).

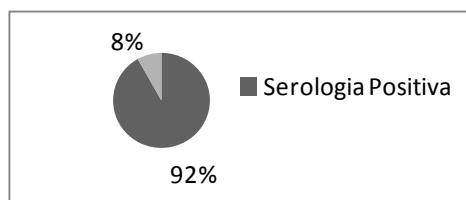


Figura 2 - Resultados da serologia dos doentes internados na UCI com diagnóstico de sépsis.

Um total de 59 amostras dos 22 doentes em estudo, com uma média de 2,73 de amostras (Mín=1;Máx=5) por doente, foi utilizado para detecção da reactivação do CMV. As amostras foram recolhidas de forma contínua ao longo do internamento do doente no Hospital da Luz, tentando sempre obter uma amostra por semana de internamento. O tempo de internamento varia entre os doentes, sendo que o número de amostras estudadas por doente é tanto maior, quanto maior for a sua permanência no hospital (Tabela 1).

Número de Doentes	Amostra Recolhida	Dia da colheita ¹
		Média(Mínimo;Máximo)
22	Primeira	4,68 (2;8)
17	Segunda	13,35 (10;20)
11	Terceira	21,82 (18;31)
6	Quarta	31,33 (26;40)
3	Quinta	40,67 (34;49)

¹Dia em que foi efectuada a colheita, considerando o primeiro dia como o dia de entrada do doente na UCI.

Tabela 1 - Representação da média em dias das várias colheitas realizadas ao longo do internamento.

3.2. Dados gerais dos doentes do estudo

Foram recolhidos dados dos doentes ao longo do seu internamento (Anexo V).

Dos 22 doentes em estudo, 15 (68,2%) eram do sexo masculino e os restantes 7 (31,8%) do sexo feminino, com uma média de idade de 68,82 anos compreendida entre os 44 e os 85 anos (Figura 3)

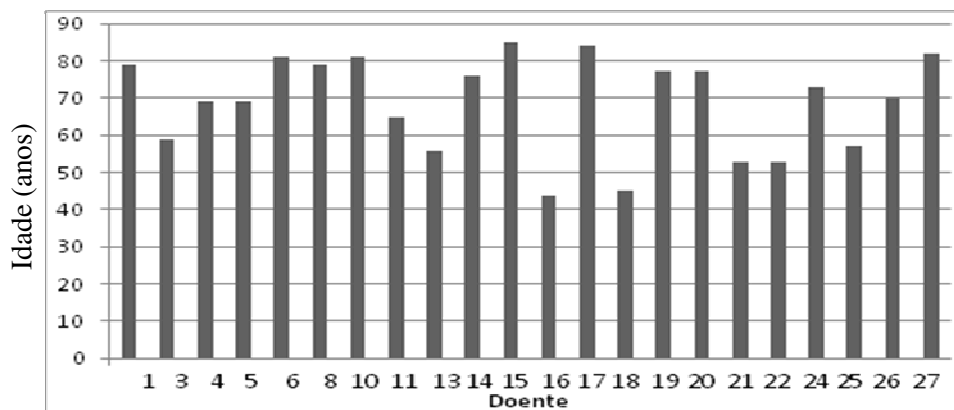


Figura 3 - Distribuição da idade dos doentes em estudo.

Dos 22 doentes incluídos no estudo, 3 apresentaram um quadro mais grave de sépsis com a presença de choque séptico e em 8 doentes do estudo ocorreu falência de pelo menos um órgão. Quanto à classificação pelo sistema APACHE II, a média obtida foi de 21,86 (Mín=14;Máx=34).

Os doentes permaneceram em média 11,93 dias (Mín=1,10;Máx=52,40) internados na UCI (Figura 4). Quanto à permanência no hospital dos doentes, incluindo o tempo de internamento na UCI e após transferência para outro serviço hospitalar, a média é de 21,82 dias, sendo o período mínimo e máximo de permanência no hospital de 5 e 50 dias, respectivamente.

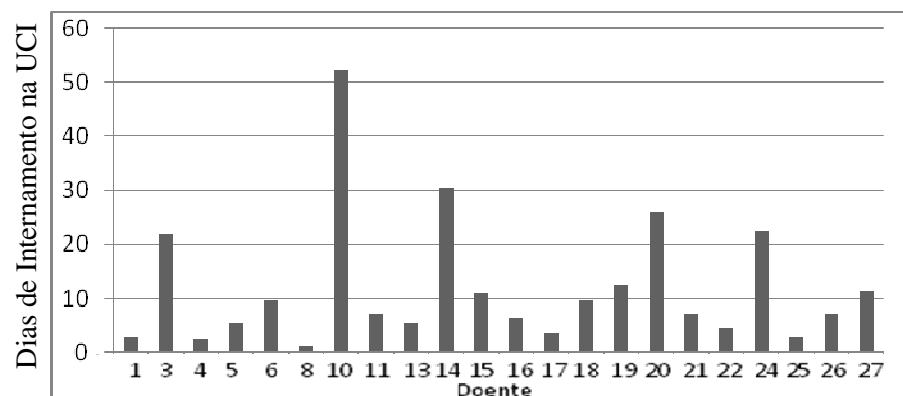


Figura 4 - Representação gráfica do tempo de permanência de cada doente do estudo na UCI.

Quanto à necessidade de ventilação mecânica, foi considerada positiva quando os doentes foram submetidos a este tipo de intervenção pelo menos uma vez desde que estiveram hospitalizados, ocorrendo em 16 doentes. A duração do tempo de ventilação foi em média de 10,07 dias (Mín=0,17; Máx=43,92).

Dos vinte e dois doentes, 3 morreram durante o seu internamento na UCI, outros 4 faleceram após transferência para outros serviços do hospital e é desconhecida a informação relativamente a dois doentes.

Ao avaliar a evolução do quadro clínico dos doentes, tendo em conta a sua sobrevivência, observa-se um quadro mais grave nos doentes que faleceram, contudo nenhuma diferença significativa foi encontrada (Tabela 2). O mesmo não acontece quando se analisa o sistema APACHE II face à falência de um ou mais órgãos nos doentes, sendo que este último está relacionado com um aumento do sistema de classificação ($p=0,01$) (Tabela 3).

	Sobreviventes	Falecidos	Valor-p
	Média (Mín-Máx)	Média (Mín-Máx)	
APACHE II	19,62 (14-26)	25 (14-32)	0,062 ¹
Tempo de Internamento hospitalar	21,08 (6-44)	27,43 (5-50)	0,363 ¹
Tempo de permanência na UCI	10,25 (2,5-26,10)	16,47 (1,10-52,40)	0,699 ²
Duração da Ventilação mecânica	7,17 (0,17-26,08)	17,49 (3,63-43,92)	0,190 ²

¹Teste t de student; ²Teste U de Mann-Whitney; * $p<0,05$

Tabela 2 - Comparação dos vários dados recolhidos nos doentes diagnosticados com sépsis, considerando os que sobreviveram e nos que faleceram.

	Falência de um ou mais órgãos		Valor-p
	Não	Sim	
	Média (Mín-Máx)	Média (Mín-Máx)	
APACHE II	19,43 (14-28)	26,13 (20-34)	0,010 ¹ *

¹Teste t de student; * $p<0,05$

Tabela 3 - Comparação do sistema de classificação APACHE II nos doentes diagnosticados com sépsis com falência de órgãos

3.3. Análise da reactivação do CMV

Foi feita a pesquisa de ADN de CMV nas 59 amostras tendo sido detectado em 12 (20,36%) correspondentes a 8 doentes. Assim considerou-se que a taxa de reactivação do CMV nestes doentes foi de 36,4%. Esta detecção ocorreu em média após 16 dias de internamento (Min=3;Máx=39), tendo sido encontrada em três doentes logo na primeira amostra analisada (Tabela 4).

Doente	Primeira amostra positiva	Dia de colheita durante o internamento	Carga viral (cópias de ADN de CMV por ml)
1	Primeira colheita	3	801,39
3	Segunda colheita	13	651,8
4	Primeira colheita	4	134,76
14	Terceira colheita	22	1083,51
15	Quarta colheita	30	232,89
17	Segunda colheita	13	4688,19
19	Quinta colheita	39	776,8
21	Primeira colheita	4	354,95

Tabela 4 - Identificação da primeira colheita positiva no doente e o seu dia recolha.

A reactivação do CMV ocorreu em três doentes (15, 17 e 19) após transferência destes da UCI para outros serviços hospitalares. Se para a análise do tempo de reactivação do CMV excluirmos estes 3 doentes, ou seja, se tivermos apenas em conta os doentes que reactivaram o vírus durante o seu internamento na UCI, a reactivação ocorreu em 22,7% dos doentes após 9,2 dias de permanência na UCI (Mín=3;Máx=22), em vez dos 16 dias.

Dos 8 doentes com reactivação, 3 tiveram alta e 3 faleceram provavelmente ainda com infecção activa pelo vírus, pois o ADN do CMV estava presente nas últimas amostras colhidas a estes doentes.

Para completar a análise dos doentes face à reactivação do CMV, foram estudadas, com recurso a testes estatísticos, as várias relações entre os dados recolhidos de cada doente ao longo do seu tempo de internamento (n=22) (Tabela 5).

		Total de doentes	Reactivação		Valor-p
			Sim (n=8)	Não (n=14)	
Sexo	Masculino	15	5	10	1^1
	Feminino	7	4	3	
Idade (Média de anos (Mín;Máx))		68,82 (44;85)	72,75(53;85)	66,57(44;82)	$0,330^2$
APACHE II à entrada do estudo		21,86 (14;34)	21 (14;30)	22,36 (16;34)	$0,607^3$
Presença de Choque séptico		3	1	2	
Duração do internamento hospitalar (Média de dias (Mín;Máx))		21,82 (5;50)	30,25(10;44)	17(5;50)	$0,025^3*$
Duração do internamento na UCI (Média de dias (Mín;Máx))		11,93 (1,10;52,40)	11,48 (2,50;30,50)	12,20 (1,10;52,40)	$0,973^2$
Ventilação mecânica	Sim	16	7	9	$0,351^1$
	Não	6	1	5	
Duração da ventilação mecânica (Média de dias (Mín;Máx))		10,07 (0,17;43,92)	8,22 (0,17;26,33)	11,52 (0,63;43,92)	$0,681^2$
Morte do doente (n=20)	Sim	7	3	4	1^1
	Não	13	5	8	

¹Teste de Fisher, ²Teste de Mann-Whitney, ³Teste t de student; *p<0,05

Tabela 5 - Comparação das características do estado clínico dos doentes tendo em conta a reactivação do CMV.

Não foi encontrada nenhuma relação entre a idade ($p=0,330$), género ($p=1$); classificação APACHE II ($p=0,607$), duração do internamento na UCI ($p=0,973$) e morte do doente ($p=1$). Embora a necessidade de ventilação mecânica tenha ocorrido em 87,5% (7/8) dos doentes com reactivação e em 64,3% (9/14) dos doentes sem reactivação, a diferença não foi significativa ($p=0,351$), bem como a duração da ventilação mecânica ($p=0,681$). Contudo foi encontrada uma diferença significativa nos dias de internamento hospitalar, sendo que os doentes com reactivação do CMV têm um maior tempo de hospitalização que os doentes sem reactivação ($p=0,025$).

3.4. Relação entre a gravidade da infecção e a carga viral

Para determinar se a carga viral influencia o estado clínico do doente, procedeu-se à comparação dos dados recolhidos durante a investigação entre os doentes que obtiveram uma carga inferior a 1000 cópias de ADN de CMV por ml durante a reactivação (n=5; 62,5%) e os doentes que obtiveram uma carga viral superior a 1000 cópias de ADN por CMV por ml (n=3; 37,5%) (Tabela 6).

		Doentes com carga viral > 1000 cópias de ADN de CMV/ml (n=3)	Doentes com carga viral < 1000 cópias de ADN de CMV/ml (n=5)	Valor-p
APACHE II		20,33 (14;26)	21,40 (14;30)	0,824 ¹
Ventilação Mecânica	Sim	2	5	0,375 ¹
	Não	1	0	
Duração da Ventilação Mecânica (Média (Mín;Máx))		14,56 (2,79;26,33)	5,68 (0,17;11,29)	0,277 ²
Tempo de internamento na UCI (Média (Mín;Máx))		13,70 (3,50;30,50)	10,14 (2,50;21,90)	0,727 ²
Tempo de internamento hospitalar (Média (Mín;Máx))		26,33 (17;32)	32,60 (10;44)	0,447 ²
Morte do Doente	Sim	2	1	0,464 ¹
	Não	1	4	

¹Teste Exacto de Fisher, ²Teste t de Student.

Tabela 6 - Comparação das características do estado clínico dos doentes tendo em conta a carga viral do doente.

Apesar de um menor número de doentes com carga superior a 1000 cópias/ml tenha necessitado de ventilação mecânica, a duração dessa ventilação foi superior quando comparado com os doentes com carga viral inferior a 1000 cópias/ml. Contudo nenhuma diferença significativa foi encontrada (p=0,277). O mesmo sucede no falecimento do doente (0,464), tendo falecido 3 doentes com reactivação, dois deles apresentando uma carga superior a 1000 cópias/ml. O tempo de internamento na UCI

também é superior nos doentes com carga viral superior a 1000 cópias/ml embora a diferença não seja significativa ($p=0,727$). Os doentes com cargas virais inferiores a 1000 cópias/ml, tendem a apresentar uma maior classificação APACHE II ($p=0,824$), bem como um maior tempo de internamento hospitalar ($p=0,447$), mas em ambos os casos a diferença não é significativa.

Quando se analisa o quadro clínico dos doentes com reactivação tendo em conta o pico da carga viral que atingiram, não existe nenhuma relação significativa com nenhum dos dados utilizados para avaliar a evolução do doente (Tabela 7).

		Pico da Carga viral	Valor-p
APACHE II		$r = -0,265$	$0,526^1$
Duração da Ventilação Mecânica		$r = -0,250$	$0,589^1$
Tempo de internamento na UCI		$r = -0,262$	$0,531^1$
Tempo de internamento hospitalar		$r = -0,524$	$0,183^1$
Morte do Doente (Média (Mín;Máx))	Sim	2246,62 (232,89;5423,46)	I^2
	Não	2058 (651,80;7196,50)	

¹Correlação de Pearson; ²Teste U de Mann Whitney; * $p<0,05$

Tabela 7 – Estudo da gravidade da doença tendo em conta o pico da carga viral atingido.

3.5. Comparação das duas técnicas de PCR em tempo real

3.5.1. Comparação qualitativa das duas técnicas

Existem dois doentes em que o seu estado clínico (9 e 12) só foi revisto após realização da comparação das duas técnicas de PCR em tempo real. Como tal, inclui-se as amostras nesta análise das técnicas de PCR em tempo real, perfazendo um total de 65 amostras a analisar no total (Anexos VI e VII). Os resultados das duas técnicas de PCR em tempo real realizadas são concordantes em 93,8 % dos casos (Tabela 8).

	PCR em tempo real <i>in house</i>			Total
		Positivo	Negativo	
PCR em tempo real CMV HHV6, 7, 8, R-gene [®]	Positivo	12	4	16
	Negativo	0	49	49
	Total	12	53	65

Tabela 8 - Comparação dos resultados obtidos pelas duas técnicas de PCR em tempo real.

As duas técnicas apresentam resultados discordantes nomeadamente em 4 amostras, com um valor negativo na técnica *in house* mas positivo na técnica comercial, que

apresentam uma carga viral baixa, sendo a média de 528,65 ($2,72\log_{10}$) cópias/ml (Mínimo:134,76; Máximo:863,51). Mas apesar de uma tendência para uma maior sensibilidade na técnica comercial em relação à técnica *in house*, visto detectar um maior número de amostras positivas para o CMV, a diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,101$ pelo Teste Exacto de Fisher). Contudo, e embora em 3 resultados da PCR em tempo real *in house* os valores de cópias por ml foram inferiores à sensibilidade estimada do método (200 cópias/ml), os valores foram utilizados para posterior comparação entre as técnicas.

3.5.2. Comparação quantitativa das duas técnicas

De forma a determinar se existe uma boa relação entre estas duas técnicas, foi analisada a correlação entre as cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real, utilizando as amostras que tiveram valores positivos em ambas as técnicas ($n=8$) (Figura 5).

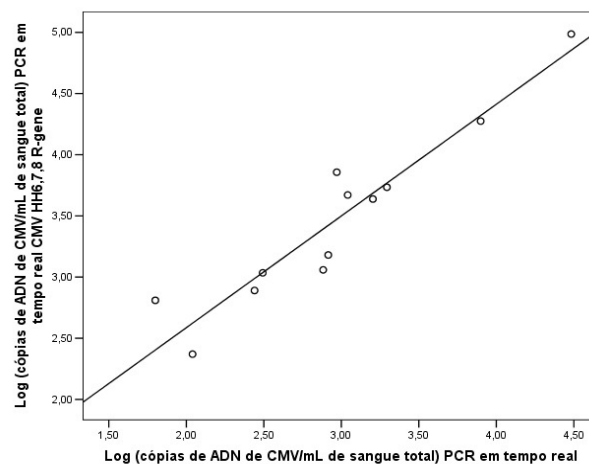


Figura 5 - Correlação entre as cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real.

É observada uma boa correlação positiva (Correlação de Pearson=0,905, $p=0,002$) entre as duas técnicas de PCR em tempo real. Mas embora estatisticamente apresentem uma boa correlação, as cargas virais obtidas para a mesma amostra pelas duas técnicas correspondem a diferentes valores.

A análise da comparação das médias destes valores obtidos revelou uma diferença significativa entre o logaritmo da carga viral obtido pela técnica comercial (Média=3,46;s=0,72) e pela técnica *in house* (Média=2,95;s=0,74), $p<0,001$ (Teste t para amostras emparelhadas). A média da carga viral obtida pela técnica comercial é

superior $0,51\log_{10}$ quando comparada com a média da técnica *in house* implementada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas (Figura 6). É atribuída assim uma maior carga viral a uma amostra quando esta é analisada pela técnica comercial da Argene.

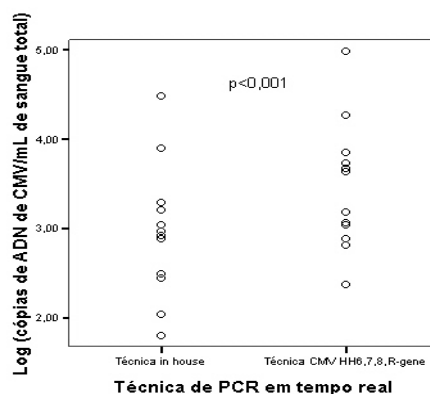


Figura 6 - Representação gráfica das médias das cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real para as mesmas amostras.

3.5.3. Quantificação da AD169 utilizada como padrão na técnica de PCR em tempo real *in house*

De forma a compreender a diferença nos valores das cargas virais das amostras nas duas técnicas de PCR em tempo real, procedeu-se à quantificação da AD169 utilizada na técnica *in house* para efectuar a curva padrão.

O valor esperado da carga viral de CMV presente na AD169 é de $1,65 \times 10^5$ cópias/ml ($5,23\log_{10}$). Quando tratada e quantificada pela técnica comercial como uma amostra de valor de carga viral desconhecida, obteve-se da AD169 uma média de valores em duplicado e em duas corridas de $1,25 \times 10^6$ cópias/ml ($6,10\log_{10}$), apresentado uma diferença de $0,87\log_{10}$ em relação ao valor anteriormente utilizado.

Esta diferença poderá justificar a variação dos valores das cargas virais quando se utilizam as duas técnicas de PCR em tempo real. Ao realizar a técnica *in house*, associando ao padrão um valor de cópias de CMV inferior ao real, os valores que irão resultar das amostras serão inferiores aos verdadeiros. Para comprovar, fez-se o ajustamento dos padrões da técnica *in house*.

3.5.4. Técnica de PCR em tempo real *in house* após ajustamento do valor do padrão

Para o ajustamento da técnica *in house*, alterou-se o valor de $1,65 \times 10^5$ para $1,25 \times 10^6$ cópias/ml, sendo considerado este valor o padrão de carga viral mais elevada para a realização da curva padrão. Com os restantes padrões utilizados à semelhança da técnica descrita (diluições seriadas de 1 para 10 desta AD169), foram obtidos novos resultados das cargas virais das amostras (Anexo VIII).

Com este novo ajuste da técnica *in house* verificou-se uma diferença significativa das cargas das amostras entre a técnica *in house* antes (Média=2,95;s=0,74) e depois do ajustamento (Média=3,45;s=0,70), $p < 0,001$ (Teste t para amostras emparelhadas) (Figura 7). Continua a não se detectar qualquer sinal de amplificação nas quatro amostras que apresentavam anteriormente um resultado negativo.

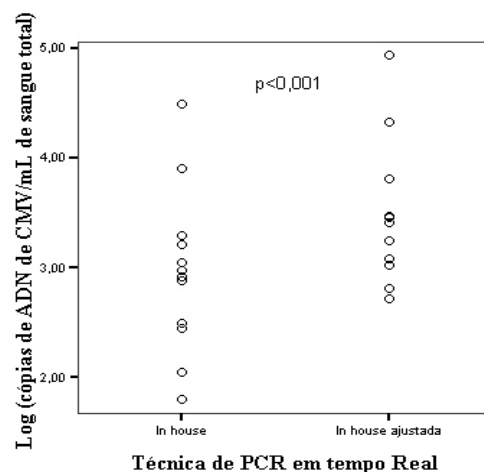


Figura 7 - Representação gráfica das médias das cargas virais obtidas pelas duas técnicas de PCR em tempo real *in house*, antes e depois ajustamento.

3.5.4.1. Sensibilidade da técnica *in house* após ajustamento

Determinou-se a sensibilidade deste novo método através de diluições seriadas de um controlo externo, sendo a última diluição detectada em medições consecutivas de 261,47 cópias de CMV por ml.

3.5.5. Comparação das técnicas de PCR em tempo real comercial e *in house* ajustada

Após comparação da técnica comercial com a técnica *in house* após o ajustamento, verifica-se que continua a existir uma boa e significativa correlação (Correlação de Pearson=0,957, $p<0,001$) (Figura 8).

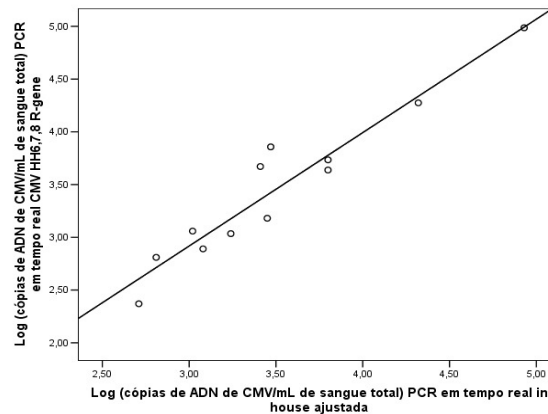


Figura 8 - Correlação entre as cargas virais quantificadas pela técnica de PCR em tempo real *in house* ajustada e pelo PCR em tempo real CMV HH6,7,8 R-gene.

Com este ajustamento da técnica *in house*, foi possível a comparação das cargas obtidas pelas técnicas (Teste t para amostras emparelhadas), não se tendo verificado uma diferença significativa entre os resultados da técnica *in house* ajustada (Média=3,50; $s=0,63$) e da técnica comercial (Média=3,46; $s=0,72$), $p=0,483$) (Figura 9).

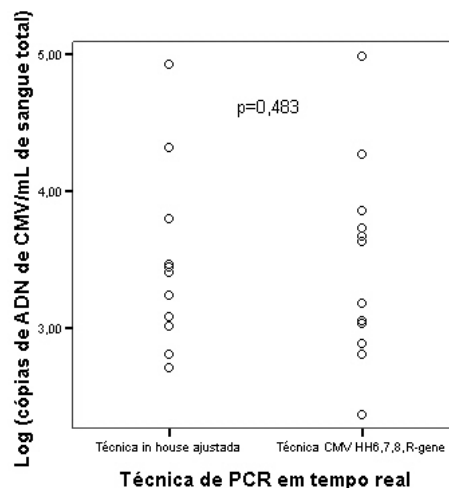


Figura 9 - Representação gráfica da diferença das médias das cargas virais obtidas pela técnica *in house* após ajustamento e técnica comercial.

3.6. Análise de Citocinas

Oito doentes dos 24 em estudo, tiveram apenas uma amostra colhida, por alta ou por morte do doente, tendo sido excluídos da investigação das concentrações das citocinas.

3.6.1 Limites de sensibilidade e detecção

Foram determinadas as concentrações das 9 citocinas para cada amostra (Anexos IX e X). Na tabela seguinte (Tabela 9), estão referenciados os valores máximos e mínimos de quantificação, bem como os limites de detecção para cada citocina estudada.

	Limite de Detecção (LD) (pg/ml)	Limite Superior de Quantificação (LSQ) (pg/ml)	Limite Inferior de Quantificação (LIQ) (pg/ml)
IL-1 α	0,3	4000	5,6
IL-1 β	2,0	9500	13,9
IL-2	0,7	3600	15,1
IL-4	0,2	1900	2,3
IL-6	0,6	3200	5,0
IL-8	0,4	2000	2,8
IL-10	0,3	3350	4,9
INF α	1,2	7500	10,5
TNF- α	1,4	4000	5,8

Tabela 9 - Limites de detecção e de quantificação da técnica de leitura da concentração das citocinas.

A IL-2 não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas, pois a sua concentração foi sempre inferior ao limite de detecção da técnica. As concentrações da IL-1 α e do INF- α , embora tenham, em metade das amostras estudadas, apresentado valores acima do limite de detecção, estes eram inferiores ao limite de quantificação, não sendo possível a sua utilização na comparação não só entre os doentes com sépsis e os doentes do grupo controlo sem processo inflamatório, como também nos doentes com sépsis que reactivaram ou não o CMV.

As restantes citocinas foram detectadas em todas as amostras, existindo algumas com valores de concentração entre o limite de detecção (LD) e o limite inferior de quantificação (LIQ). Para a comparação das concentrações das citocinas, principalmente no grupo controlo, foram estabelecidos critérios para possibilitar a execução dos testes estatísticos: (a) quando a concentração da citocina na amostra é superior ao LD mas

inferior ao LIQ, a concentração considerada corresponde ao valor do LD dessa citocinas; (b) quando a concentração é inferior ao LD, considerou-se que a concentração das citocinas correspondente a metade do valor do LD para essa citocina.

3.6.2. Análise das citocinas em doentes com processo inflamatório

3.6.2.1. Comparação dos Controlos e dos doentes com processo inflamatório

De forma a determinar se existe alguma diferença nas concentrações das citocinas em doentes sem e com processo inflamatório, comparou-se a média das concentrações nestes dois grupos. No caso de doentes com processo inflamatório analisou-se a concentração das citocinas à entrada do estudo (Tabela 10, Figura 10).

	Controlo (n=16)		Doentes com processo inflamatório		Valor – p
	Média (pg/ml)	Mínimo; Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	3,00	1-16,21	20,45	12,42-58,16	<0,001 ¹ *
IL-4	0,16	0,1-0,2	2,75	0,20-4,12	<0,001 ¹ *
IL-6	2,92	0,3-7,49	77,07	8,22-244,59	<0,001 ¹ *
IL-8	12,00	6,95-18,13	81,23	19,55-232,56	<0,001 ¹ *
IL-10	3,01	0,15-7,65	11,55	0,30-55,25	<0,001 ¹ *
TNF- α	4,29	0,7-19,78	22,86	7,42-69,05	<0,001 ¹ *

¹Teste U de Mann Whitney; *p<0,05

Tabela 10 - Comparação das concentrações das citocinas nos grupos Controlo e Doentes com processo inflamatório.

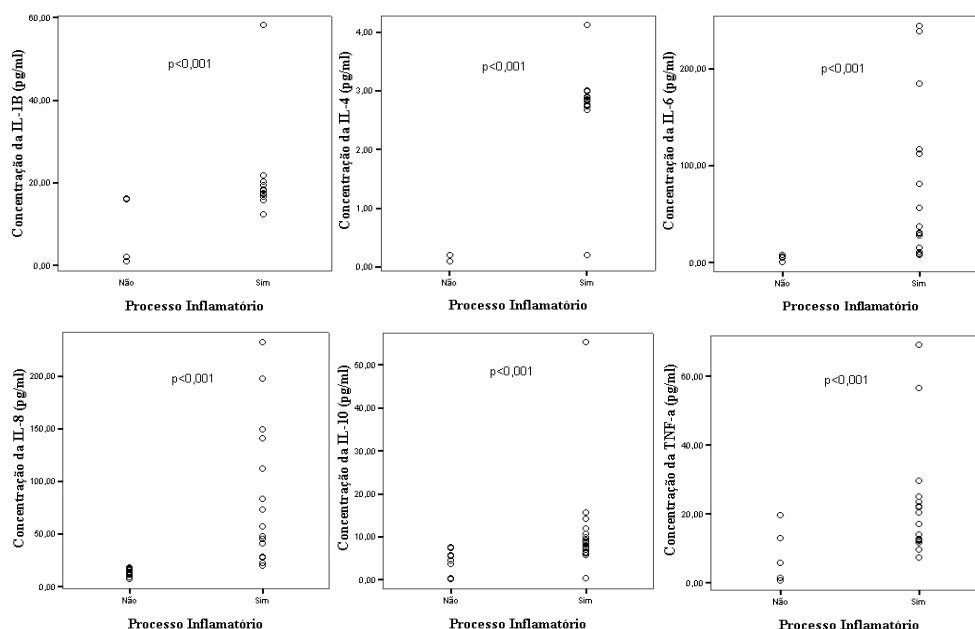


Figura 10 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas no grupo Controlo sem processo inflamatório e no grupo de doentes com processo inflamatório.

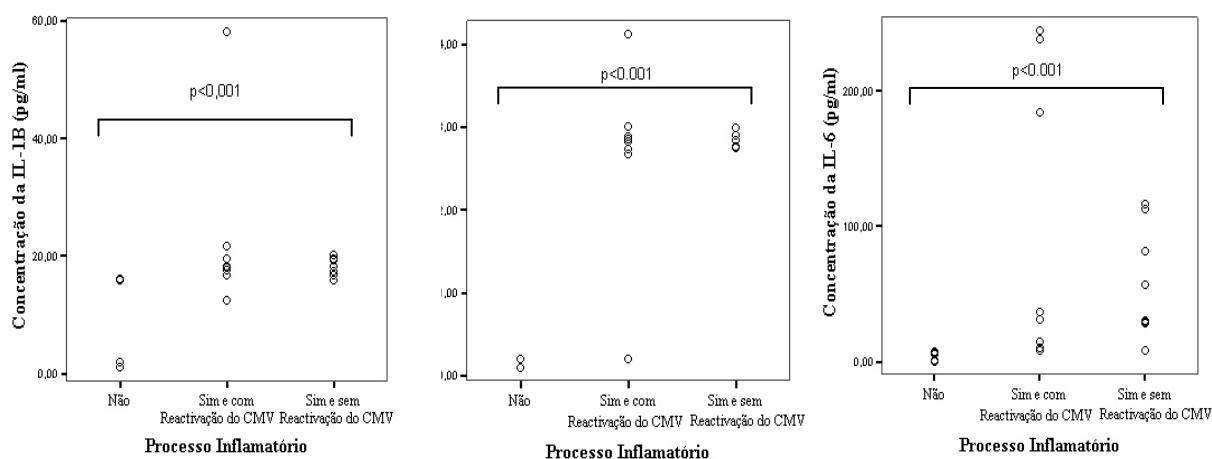
Através desta comparação, observou-se uma diferença estatisticamente significativa ($p<0.05$) entre as concentrações nos indivíduos com e sem processo inflamatório, tendo o primeiro concentrações mais elevadas. Mas, sendo a reactivação do CMV o principal objectivo desta investigação, dividiu-se o grupo representante dos doentes com processo inflamatório em dois subgrupos tendo em conta a ocorrência ou não de reactivação do CMV (Tabela 11, Figura 11).

11A	Controlo		Doentes com Reactivação		Valor – p
	Média (pg/ml)	Mínimo;Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	3,00	1-16,21	22,31	12,42-58,16	$<0,001^1*$
IL-4	0,16	0,1-0,2	2,98	2,68-4,12	$<0,001^1*$
IL-6	2,92	0,3-7,49	86,79	8,26-244,59	$<0,001^1*$
IL-8	12,00	6,95-18,13	77,93	19,55-197,48	$<0,001^1*$
IL-10	3,01	0,15-7,65	9,81	6,10-15,65	$<0,001^1*$
TNF- α	4,29	0,7-19,78	25,36	9,78-56,54	$<0,001^1*$

11B	Controlo		Doentes com Reactivação		Valor – p
	Média (pg/ml)	Mínimo;Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	3,00	1-16,21	18,10	IL-1 β	$<0,001^1*$
IL-4	0,16	0,1-0,2	2,85	IL-4	$<0,001^1*$
IL-6	2,92	0,3-7,49	57,98	IL-6	$<0,001^1*$
IL-8	12,00	6,95-18,13	80,35	IL-8	$<0,001^1*$
IL-10	3,01	0,15-7,65	13,55	IL-10	$<0,001^1*$
TNF- α	4,29	0,7-19,78	23,38	TNF- α	$<0,001^1*$

¹Teste U de Mann Whitney; * $p<0,05$

Tabela 11 - Comparação das concentrações das citocinas nos grupos Controlo e Doentes com reactivação (11A) e sem reactivação (11B).



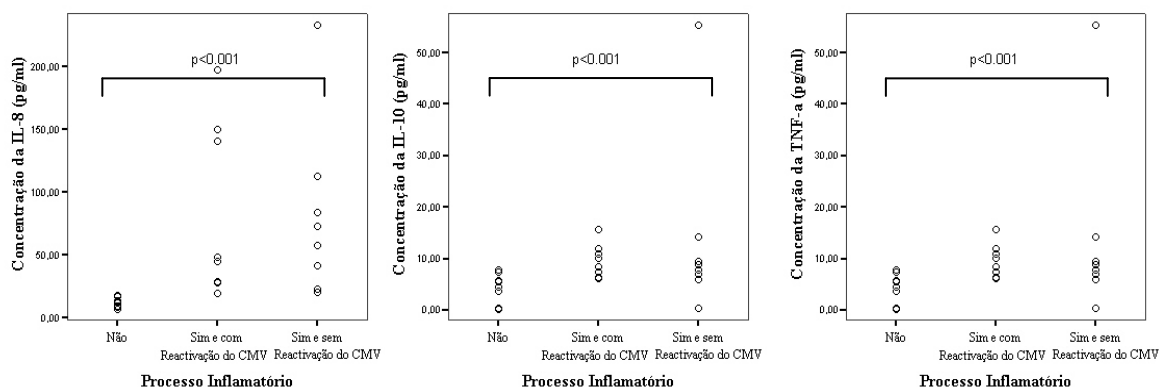


Figura 11 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos grupos: Controlo, Doentes com Reactivação e Doentes sem reactivação.

Presenciou-se uma diferença significativa entre as concentrações das citocinas no grupo controlo e os doentes com sépsis e com reactivação do CMV ($p < 0,001$), apresentando estes últimos concentrações mais elevadas que os controlos. O mesmo se verificou aquando a comparação entre os controlos e os doentes com sépsis mas sem reactivação do CMV ($p < 0,001$).

3.6.2.2. Evolução dos doentes com processo inflamatório

Pela comparação da concentração das citocinas determinada para todos os doentes da UCI diagnosticados com sépsis, observou-se que em todas as citocinas estudadas as concentrações eram mais elevadas que os controlos aquando a entrada do doente no estudo. Para perceber a evolução dos doentes em estudo, analisou-se e comparou-se a média da concentração das várias citocinas ao longo das duas semanas de internamento no hospital (n=14) (Tabela 12, Figura 12).

	Doentes com processo inflamatório				valor – p
	Entrada		2ª Semana		
	Média (pg/ml)	Mínimo;Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1β	20,93	15,89-58,16	19,01	16,76-29,17	0,594 ^I
IL-4	2,93	2,68-4,12	2,96	2,72-3,42	0,660 ^I
IL-6	83,23	8,26-244,59	35,66	7,51-114,86	0,022^{I,2*}
IL-8	80,11	19,55-232,56	83,63	10,21-285,16	0,594 ^I
IL-10	11,75	0,30-55,25	5,58	0,30-15,83	0,033^{I,3*}
TNF-α	23,67	7,42-69,05	17,40	9,09-59,04	0,109 ^I

¹Teste de Wilcoxon, * $p < 0,05$; ²11 doentes exibiram uma concentração da citocina IL-6 superior na entrada do estudo e os restantes 3 uma concentração superior na segunda semana de internamento. ³11 doentes exibiram uma concentração da citocina IL-10 superior na entrada do estudo, 2 uma concentração superior na segunda semana de internamento e 1 manteve a mesma concentração.

Tabela 12 - Estudo da evolução dos doentes com processo inflamatório durante as duas primeiras semanas de internamento.

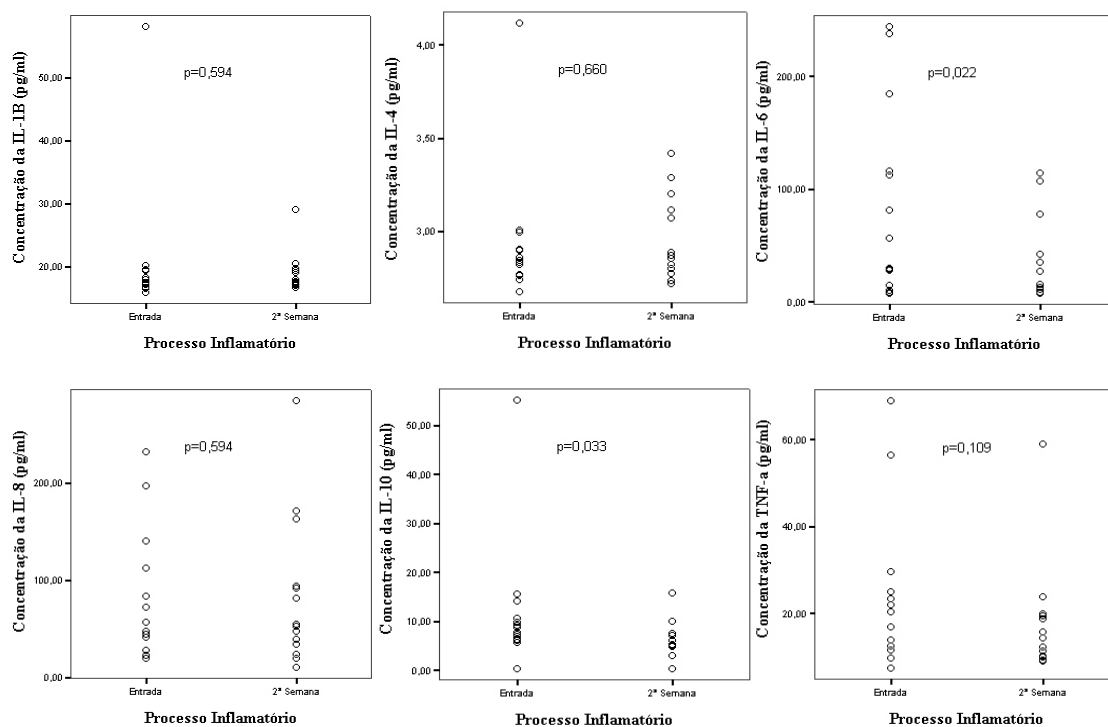


Figura 12 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos doentes com processo inflamatório ao longo das duas semanas de internamento.

Ao longo das duas semanas de internamento dos doentes diagnosticados com sépsis na UCI, a concentração da IL-6 e da IL-10 diminuiu, apresentando uma diferença significativa entre a concentração destas citocinas nos doentes à entrada do estudo e após duas semanas de internamento ($p < 0,05$). Tanto a IL-6 como a IL-10 diminuíram ao longo das duas semanas em grande parte dos doentes, havendo uma excepção para IL-6 em três doentes (dois com reactivação e outro sem reactivação do CMV) e para a IL-10 em dois doentes (um com reactivação e outro sem reactivação do CMV). Nas restantes citocinas, é observada uma ligeira diminuição da IL-1β e do TNF-α, e um ligeiro aumento da IL-4 e da IL-8, mas estas diferenças não são significativas.

3.6.2.3. Concentração das citocinas e a avaliação do quadro clínico dos doentes com processo inflamatório ao longo das duas semanas de internamento

Fez-se a análise da relação da concentração das citocinas tendo em conta o tempo de internamento na UCI e no hospital, a classificação APACHE II, a duração da ventilação mecânica e a morte do doente (Tabela 13, Tabela 14).

	Tempo de Internamento na UCI	Tempo de Internamento	APACHE II	Duração da ventilação
Entrada				
IL-1β				
Correlação	0,068	-0,378	-0,067	-0,119
Valor-p	0,803 ¹	0,149 ¹	0,807 ¹	0,713 ¹
IL-4				
Correlação	0,334	0,304	-0,341	0,308
Valor-p	0,206 ¹	0,253 ¹	0,196 ¹	0,331 ¹
IL-6				
Correlação	-0,024	0,035	-0,310	0,203
Valor-p	0,931 ¹	0,896 ¹	0,242 ¹	0,527 ¹
IL-8				
Correlação	0,066	0,150	-0,099	0,119
Valor-p	0,807 ¹	0,578 ¹	0,354 ¹	0,713 ¹
IL-10				
Correlação	-0,028	0,088	-0,170	-0,168
Valor-p	0,918 ¹	0,744 ¹	0,529 ¹	0,602 ¹
TNF-α				
Correlação	0,013	0,201	0,248	-0,056
Valor-p	0,961 ¹	0,456 ¹	0,354 ¹	0,863 ¹
2ªSemana				
IL-1β				
Correlação	0,015	0,219	-0,124	-0,042
Valor-p	0,958 ¹	0,453 ¹	0,674 ¹	0,907 ¹
IL-4				
Correlação	0,123	-0,126	0,018	-0,224
Valor-p	0,675 ¹	0,668 ¹	0,952 ¹	0,533 ¹
IL-6				
Correlação	-0,055	0,099	0,108	-0,091
Valor-p	0,852 ¹	0,735 ¹	0,713 ¹	0,803 ¹
IL-8				
Correlação	0,508	0,241	0,150	0,418
Valor-p	0,064 ¹	0,407 ¹	0,608 ¹	0,229 ¹
IL-10				
Correlação	0,307	0,058	0,445	0,176
Valor-p	0,286	0,844 ²	0,111 ²	0,627 ¹
TNF-α				
Correlação	0,174	0,267	0,223	0,164
Valor-p	0,553 ¹	0,356 ¹	0,444 ¹	0,651 ¹

¹Correção de Spearman; ²Correlação de Pearson; *p<0,05

Tabela 13 - Distribuição da concentração das citocinas dos doentes com processo inflamatório, tendo em conta a evolução do quadro clínico do doente.

Não foi encontrada qualquer relação significativa entre a concentração das citocinas e o tempo de internamento na UCI e no hospital, APACHE II e duração da ventilação.

14A	Entrada				valor – p
	Sobreviventes		Falecidos		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	21,83	12,42-58,16	17,42	16,66-15,89	0,221 ¹
IL-4	2,72	0,2-4,12	2,82	2,68-3,00	0,583 ¹
IL-6	64,53	8,57-238,56	104,65	8,26-244,59	0,661 ¹
IL-8	72,86	20,14-197,48	99,64	19,55-232,56	0,661 ¹
IL-10	13,84	5,81-55,25	6,50	0,3-9,97	0,180 ¹
TNF- α	26,66	7,42-69,05	16,68	9,78-23,44	0,583 ¹

14B	2ª Semana				valor – p
	Sobreviventes		Falecidos		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	19,61	17,10-29,17	17,43	16,76-19,52	0,518 ¹
IL-4	2,99	2,78-3,42	2,89	2,72-3,29	0,364 ¹
IL-6	30,96	8,25-114,86	44,13	7,51-107,78	1 ¹
IL-8	64,29	19,82-171,17	118,46	10,21-285,16	0,518 ¹
IL-10	4,99	0,3-10,12	6,63	0,30-15,83	1 ¹
TNF- α	19,28	9,09-59,04	14,02	9,38-20,03	0,898 ¹

¹Teste U de Mann Whitney, * $p < 0,05$

Tabela 14 - Concentração das citocinas à entrada (14A) e após duas semanas de internamento (14B) nos doentes que sobreviveram e nos doentes que faleceram.

Quanto à análise da concentração das citocinas tendo em conta a sobrevivência dos doentes, não foi encontrada nenhuma diferença significativa, mesmo que se verifique uma maior concentração da IL-8 à entrada do estudo, e das IL-6, IL-8 e IL-10 após duas semanas de internamento nos doentes que faleceram.

3.6.2.4. Relação entre as várias citocinas ao longo do estudo

De forma a determinar se existe alguma relação entre as várias citocinas estudadas, procedeu-se ao estudo da correlação das citocinas à entrada do estudo (Tabela 15).

	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α
Entrada					
IL-1β					
Correlação (r)	0,226	0,309	0,426	JD	0,159
Valor-p	0,399 ^I	0,244 ^I	0,099 ^I		0,557 ^I
IL-6					
Correlação (r)	-0,103	1	JD	JD	JD
Valor-p	0,704 ^I				
IL-8					
Correlação (r)	0,556	0,071	1	JD	JD
Valor-p	0,025 ^{I*}	0,795 ^I			
IL-10					
Correlação (r)	-0,035	0,318	-0,153	1	JD
Valor-p	0,897 ^I	0,231 ^I	0,572 ^I		
TNF-α					
Correlação (r)	-0,174	0,185	-0,203	0,826	1
Valor-p	0,520 ^I	0,492 ^I	0,451 ^I	<0,001 ^{I*}	
2ªSemana					
IL-1β					
Correlação (r)	0,385	0,754	0,314	0,280	0,574
Valor-p	0,174 ^I	0,002 ^{I*}	0,274 ^I	0,332 ^I	0,032 ^{I*}
IL-6					
Correlação (r)	0,449	1	JD	0,287	JD
Valor-p	0,107 ^I			0,319 ^I	
IL-8					
Correlação (r)	0,143	0,332	1	JD	JD
Valor-p	0,626 ^I	0,246 ^I			
IL-10					
Correlação (r)	0,287	0,634	0,673	1	JD
Valor-p	0,319 ^I	0,015 ^{I*}	0,008 ^{I*}		
TNF-α					
Correlação (r)	0,462	0,516	0,108	0,263	1
Valor-p	0,096 ^I	0,059 ^I	0,714 ^I	0,364 ^I	

^ICorreção de Spearman *p<0,05; JD – já determinado

Tabela 15 - Correlação entre as concentrações das citocinas à entrada do estudo.

À entrada do estudo foi observada uma correlação boa e significativa entre a IL-10 e o TNF- α ($r=0,826$; $p<0,001$), e uma correlação mais baixa, mas significativa, entre a IL-4 e IL-8 ($r=0,556$; $p=0,025$). Na segunda semana de internamento, é detectada uma correlação significativa entre IL-1 β com a IL6 ($p<0,002$) e o TNF- α ($p=0,032$) e a IL-10 com a IL-6 ($p=0,015$) e a IL-8 ($p=0,008$).

3.6.3. Análise das Citocinas tendo em conta a reactivação do CMV

3.6.3.1. Concentração das Citocinas nos doentes com e sem reactivação do CMV à entrada do estudo

Procedeu-se à comparação das concentrações das citocinas nos doentes com (n=8) e sem reactivação (n=8) do CMV nas amostras colhidas à entrada do doente no estudo (Tabela 16, Figura 13).

	Doentes com reactivação do CMV		Doentes sem reactivação do CMV		Valor-p
	Média (pg/ml)	Mínimo-Maximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Maximo	
IL-1 β	22,80	12,42-58,16	18,10	15,89-20,22	0,721 ¹
IL-4	2,66	0,20-4,12	2,85	2,75-3,00	0,798 ¹
IL-6	96,15	8,26-244,59	57,98	8,57-116,73	0,878 ¹
IL-8	82,10	19,55-197,48	80,35	20,14-232,56	0,959 ¹
IL-10	9,55	6,10-15,65	13,54	5,81-55,25	0,721 ¹
TNF- α	22,34	9,78-56,54	23,38	7,42-69,05	0,878 ¹

¹Teste U de Mann-Whitney; * $p < 0,05$

Tabela 16 - Concentração das médias dos doentes com e sem reactivação à entrada do estudo.

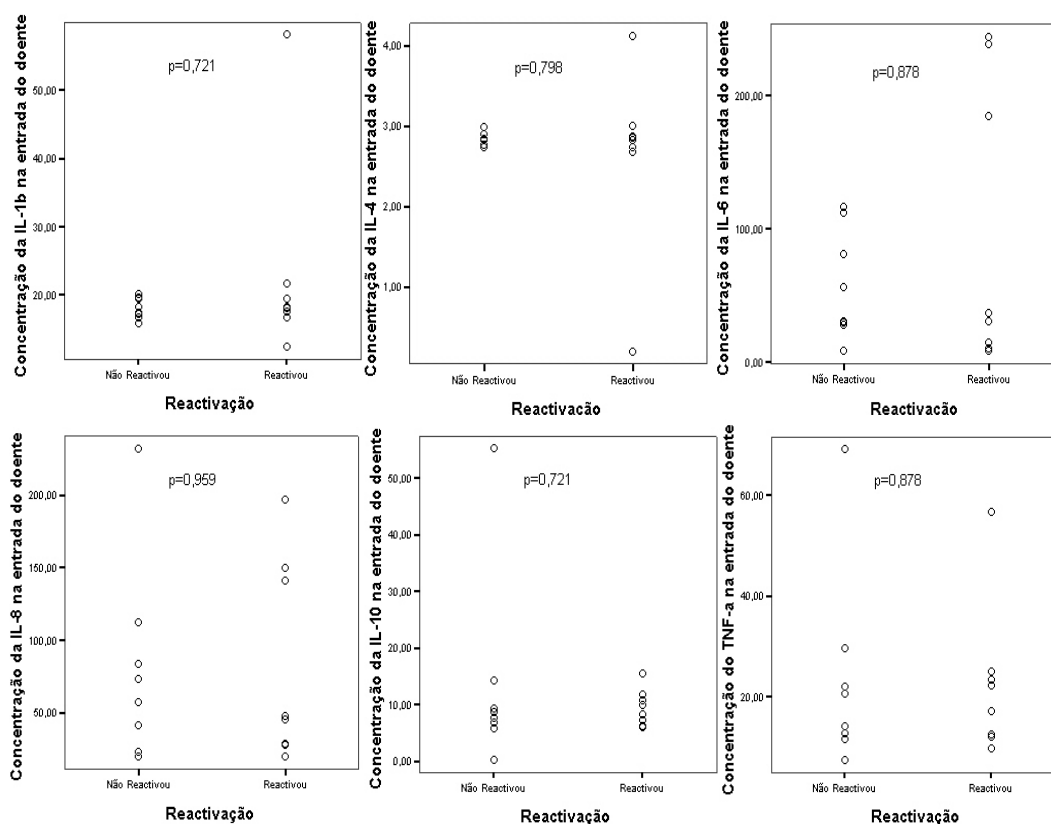


Figura 13 - Representação gráfica das distribuições das concentrações nos Doentes com e sem reactivação à entrada no estudo.

À entrada do estudo as concentrações da IL-1 β , IL-6 e IL-8 são superiores nos doentes com reactivação do CMV, e as concentrações da IL-4, IL-10 e TNF- α são superiores nos doentes sem reactivação. Contudo estas diferenças não são significativas ($p>0,05$).

3.6.3.2. Concentração das Citocinas nos doentes com e sem reactivação do CMV após duas semanas de Internamento

Sendo que a reactivação do CMV ocorreu em média na segunda semana de internamento, e que neste momento do internamento se conseguiu colher amostras a todos os doentes, comparou-se a concentração ao fim de duas semanas de internamento nos doentes com ($n=6$) e sem ($n=8$) reactivação do CMV (Tabela 17 e Figura 14).

	Doentes com reactivação do CMV		Doentes sem reactivação do CMV		Valor-p
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	20,22	16,76-29,17	18,09	17-10-19,80	0,491 ¹
IL-4	3,03	2,83-3,29	2,90	2,72-3,42	0,142 ¹
IL-6	56,18	9,02-114,86	20,27	7,51-42,88	0,282 ¹
IL-8	123,00	24,41-285,16	54,11	10,21-94,51	0,228 ¹
IL-10	7,39	0,30-15,83	4,21	0,30-7,66	0,218 ²
TNF- α	23,74	9,09-59,04	12,64	9,27-19,58	0,181 ¹

¹Teste U de Mann-Whitney; ²Teste T de student; * $p<0,05$

Tabela 17 - Concentração das médias dos doentes com e sem reactivação após duas semanas de internamento.

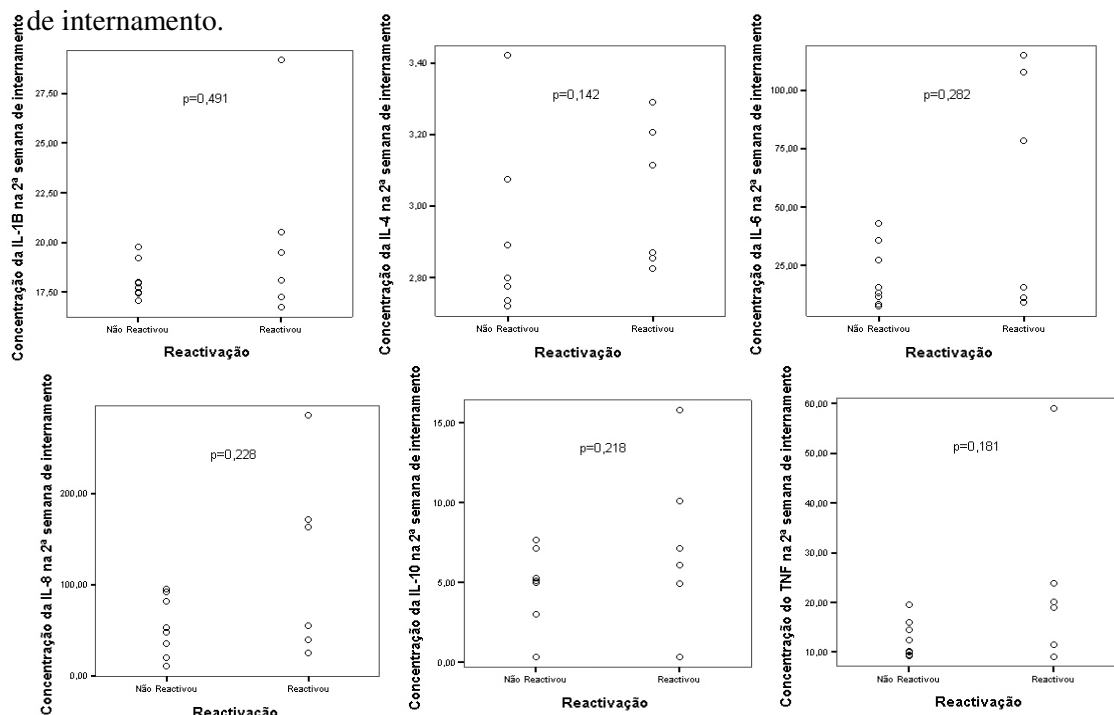


Figura 14 - Representação gráfica das distribuições das concentrações nos Doentes com e sem reactivação após duas semanas de internamento.

Embora esteja presente uma tendência para uma maior concentração em todas as citocinas nos doentes com reactivação, quando comparando com a concentração dos doentes sem a reactivação do CMV, nenhuma diferença significativa é encontrada.

3.6.3.3. Evolução da concentração de citocinas nos doentes com reactivação do CMV durante as duas semanas de internamento

Para perceber se ao fim das duas semanas de internamento os doentes com reactivação apresentaram alguma alteração nas citocinas, procedeu-se à comparação dos dados destes doentes à entrada do estudo e após duas semanas de internamento (n=6) (Tabela 18, Figura 15).

	Doentes com reactivação do CMV				Valor-p
	Entrada		2ª Semana		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	24,71	16,66-58,16	20,22	16,76-29,17	0,463 ¹
IL-4	3,04	2,68-4,12	3,03	2,83-3,29	0,345 ¹
IL-6	116,90	8,26-244,59	56,18	9,02-114,86	0,249 ¹
IL-8	79,79	19,55-197,48	123,00	24,41-285,16	0,324 ²
IL-10	9,34	6,10-15,65	7,39	0,30-15,83	0,528 ²
TNF- α	24,07	9,78-56,54	23,74	9,09-59,04	0,753 ¹

¹Teste de Wilcoxon; ²Teste t emparelhado; * $p < 0.05$

Tabela 18 - Evolução da concentração das citocinas após as duas semanas de internamento.

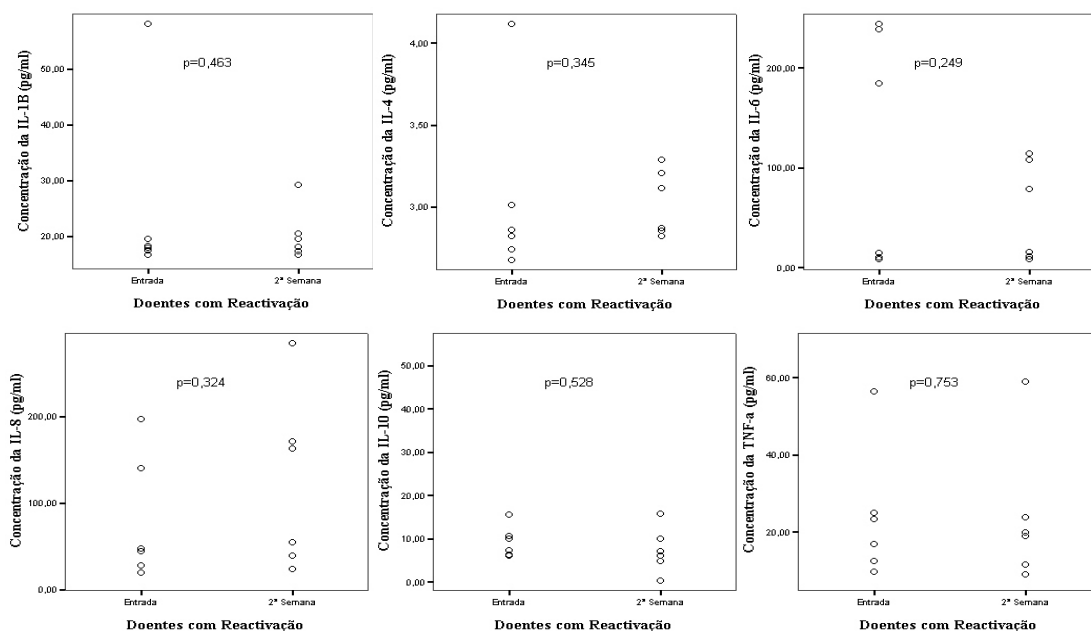


Figura 15 - Representação gráfica da evolução das concentrações das citocinas nos doentes com reactivação durante as duas semanas de internamento.

A análise dos dados permitiu observar que em duas semanas a média das concentrações das citocinas diminuiu nos doentes com reactivação do CMV, com excepção da IL-8 que aumentou. Contudo as diferenças não são significativas ($p>0,05$).

3.6.3.4. Evolução dos doentes que reactivaram o CMV depois das duas semanas de internamento

Nos doentes que reactivaram o vírus após a segunda semana de internamento ($n=4$), foi possível obter a última colheita antes da alta hospitalar ou morte do doente. Foi realizada a comparação entre as concentrações obtidas nesta colheita, e a as concentrações obtidas à entrada do doente no estudo, para tentar perceber melhor a evolução do doente (Tabela 19).

	Doentes com reactivação do CMV				Valor-p
	Entrada		Última amostra		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1β	28,17	19,66-58,16	16,92	16,37-17,99	0,063 ²
IL-4	3,10	2,68-4,12	2,96	2,88-3,11	0,715 ²
IL-6	113,10	8,26-244,59	48,82	9,02-134,01	0,273 ²
IL-8	101,45	19,55-197,48	150,13	15,09-339,21	0,363 ¹
IL-10	8,54	6,10-10,76	6,39	5,30-8,47	0,251 ¹
TNF-α	26,70	9,78-56,54	19,15	15,28-25,49	0,489 ¹

¹Teste t emparelhado; ²Teste de Wilcoxon; * $p<0,05$

Tabela 19 - Evolução da concentração das médias até alta hospitalar ou morte do doente dos doentes com reactivação do CMV.

Não foi detectada uma diferença significativa na evolução da concentração das citocinas nestes doentes ao longo do seu internamento. Embora exista uma tendência para a diminuição da concentração de todas as citocinas, exceptuando a IL-8, onde se verificou um aumento da concentração.

3.6.3.5. Evolução da concentração de citocinas nos doentes sem reactivação do CMV durante as duas semanas de internamento

Para também perceber se ocorreu alguma mudança nas concentrações à entrada e após duas semanas de internamento nos doentes sem reactivação do CMV, comparou-se as concentrações nestes dois períodos de tempo ($n=8$) (Tabela 20, Figura 16).

	Doentes sem reactivação do CMV				Valor-p
	Entrada		2ª Semana		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1β	18,10	15,89-20,22	18,10	17,10-19,80	0,979 ¹
IL-4	2,85	2,75-3,00	2,90	2,72-3,42	0,779 ²
IL-6	57,98	8,57-116,73	20,27	7,51-42,88	0,023^{1*}
IL-8	80,35	20,14-232,56	54,11	10,21-94,51	0,093 ¹
IL-10	13,56	0,30-55,25	4,21	0,30-7,66	0,043^{2,3*}
TNF-α	23.38	7.42-69.05	12.64	9.27-19.58	0.093 ¹

¹Teste T emparelhado; ²Teste de Wilcoxon; *p<0.05; ³6 doentes exibiram uma concentração da citocina IL-10 superior na entrada do estudo, 1 doente apresentou uma concentração superior na segunda semana de internamento e 1 doente apresentou uma concentração igual.

Tabela 20 - Evolução da concentração das médias dos doentes sem reactivação do CMV.

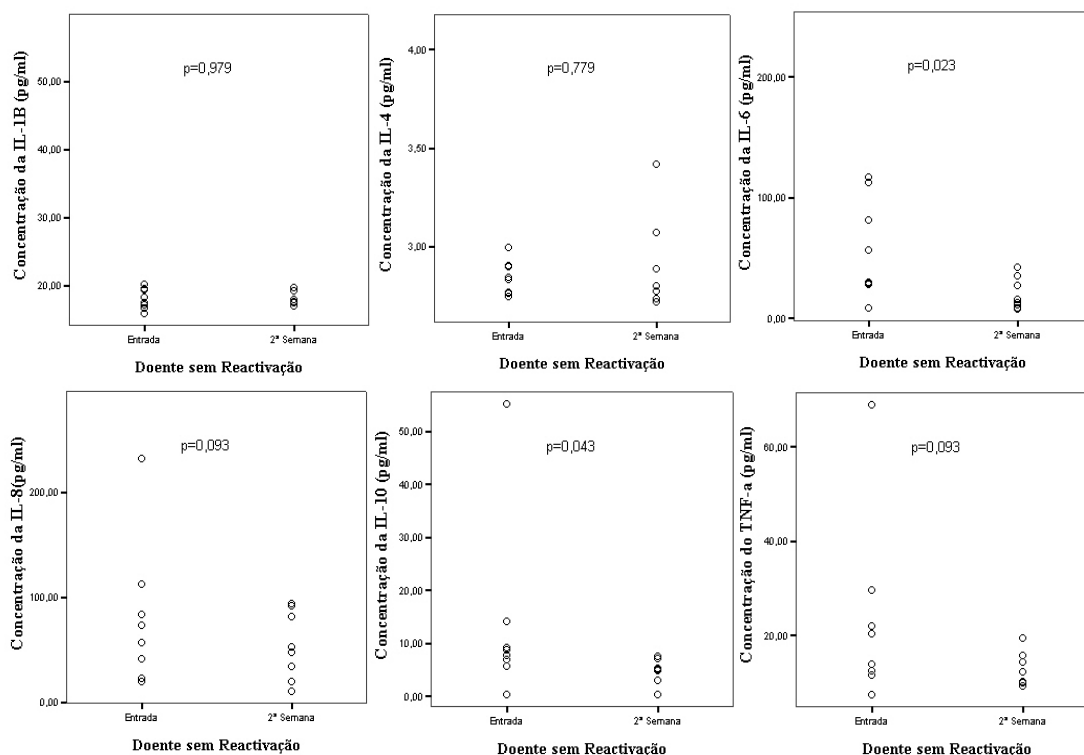


Figura 16 - Representação gráfica das distribuições das concentrações das citocinas nos doentes sem reactivação à entrada do estudo e após duas semanas de internamento.

Ao longo das duas semanas de internamento a concentração das citocinas nos doentes sem reactivação do CMV diminuíram, com excepção da IL-4. Contudo apenas duas apresentam uma diferença estatisticamente significativa, a IL-6 ($p=0,023$) e IL-10 ($p=0,043$).

3.6.3.6. Concentração das citocinas tendo em conta o tempo de reactivação do CMV

Consoante as amostras recolhidas dos doentes com reactivação do CMV, foi possível analisar a evolução das concentrações das citocinas uma (n=3) a duas (n=3) semanas antes da reactivação, de forma a tentar encontrar alguma relação entre a reactivação e alguma das citocinas analisadas. Para esta comparação foram utilizadas as concentrações das citocinas nas primeiras amostras positivas para o CMV de cada doente, e as amostras negativas uma e duas semanas antes desta reactivação.

3.6.3.6.1. Reactivação ao longo de uma semana

Foram analisadas as concentrações das citocinas nas amostras negativas e positivas para o CMV com uma semana de intervalo (Tabela 21).

	Intervalo de uma semana				Valor-p
	Amostra Negativa		Amostra Positiva		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Maximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Maximo	
IL-1 β	18,29	17,30-19,52	17,23	16,37-8,41	0,424 ²
IL-4	2,85	12,73-3,01	2,99	2,94-3,11	0,285 ¹
IL-6	124,41	26,90-232,56	228,31	14,78-642,75	1 ¹
IL-8	108,58	12,63-285,16	78,41	15,09-154,34	0,616 ²
IL-10	12,20	5,41-15,83	23,74	5,34-59,93	0,593 ¹
TNF- α	22,62	20,03-25,00	27,33	20,52-35,99	0,347 ²

¹Teste de Wilcoxon; ²Teste t para amostras emparelhadas

Tabela 21 - Relação da concentração das citocinas entre uma amostra negativa e uma positiva para o CMV com uma semana de intervalo.

Em nenhuma das citocinas estudadas foi determinada uma alteração significativa da concentração entre as amostras negativa e positiva com uma semana de intervalo, embora haja um visível aumento da concentração da IL-6 ao fim de uma semana para o dobro do valor.

3.6.3.6.2. Reactivação ao longo de duas semanas

Comparou-se as concentrações das citocinas entre uma amostra negativa e a primeira amostra positiva com duas semanas de intervalo (Tabela 22).

	Intervalo de duas semanas				Valor-p
	Amostra Negativa		Amostra Positiva		
	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	Média (pg/ml)	Mínimo-Máximo	
IL-1 β	18,04	16,76-19,05	17,2	16,59-18,09	0,320 ^l
IL-4	2,98	2,78-3,29	2,97	2,88-3,11	0,976 ^l
IL-6	72,75	11,51-84,44	37,45	14,78-78,5	0,423 ^l
IL-8	84,98	39,28-140,81	90,34	15,09-164,14	0,887 ^l
IL-10	7,45	4,91-10,12	6,31	5,82-7,16	0,535 ^l
TNF- α	17,21	9,78-22,91	15,77	11,54-20,52	0,475 ^l

^lTeste t para amostras emparelhadas

Tabela 22 - Relação da concentração das citocinas entre uma amostra negativa e uma positiva com duas semanas de intervalo.

Não foi encontrada qualquer alteração significativa na concentração entre as amostras negativa e positiva com duas semanas de intervalo. A IL-8 é a única citocina em que é detectado um aumento da concentração ao longo das duas semanas, embora não significativa.

3.6.3.7. Concentração das citocinas e carga viral

Para estudar a relação da carga viral e da concentração das citocinas, procedeu-se à análise das médias das citocinas entre a carga viral mais baixa e a carga viral mais alta nos doentes com mais do que uma amostra positiva (n=3) (Tabela 23).

	Carga viral mais baixa	Carga viral mais alta	Valor-p
	Média (Mín-Máx)	Média (Mín-Máx)	
IL-1 β	19,11 (17,51-21,74)	18,03 (17,29-19,00)	0,319 ^l
IL-4	2,86 (2,83-2,88)	2,86 (2,84-2,88)	0,939 ^l
IL-6	39,90 (10,42-78,5)	52,41 (9,02-134,00)	0,628 ^l
IL-8	119,26 (45,01-163,14)	168,24 (54,86-339,21)	0,530 ^l
IL-10	7,28 (6,27-8,41)	4,94 (0,30-8,47)	0,507 ^l
TNF- α	12,01 (11,54-12,59)	11,05 (8,73-15,32)	0,707 ^l

^lTeste t para amostras emparelhadas

Tabela 23 - Relação entre a carga viral e a concentração das citocinas.

As concentrações das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α têm tendência para ser superiores aquando uma carga viral mais baixa, mas esta diferença não é significativa ($p>0,05$). O mesmo acontece nas citocinas IL-6 e IL-8, que embora sejam mais elevadas no pico da carga viral, a diferença para com as cargas mais baixas não é significativa ($p>0,05$). Também não foi encontrada qualquer correlação significativa entre as concentrações das várias citocinas obtidas nas amostras de carga viral superior e inferior do doente (Anexo X).

4.Discussão de Resultados e Conclusão

Que seja do nosso conhecimento, até à data nunca se tinha realizado uma investigação em Portugal que determinasse a taxa de reactivação do CMV em doentes das Unidades de Cuidados Intensivos. Estes doentes mesmo não sendo alvo de uma forte imunossupressão, têm sido comparados, quanto à reactivação deste vírus, a outros doentes em risco, como é o caso de doentes transplantados (24).

Através deste estudo realizado em doentes diagnosticados com sépsis na UCI, demonstrou-se que a reactivação do CMV nestes doentes é possível de suceder e com uma taxa de reactivação de 36,4 %, na ausência de qualquer factor identificável de imunossupressão. Esta incidência da reactivação é concordante com a média (36,74% (32,4-40,7%)) de outros estudos realizados até à data em doentes internados na UCI, utilizando o mesmo método de pesquisa de infecção activa por CMV – técnica de PCR em tempo real (30, 72, 73, 98, 104). Estudos que utilizam a antigenémia como técnica de detecção de infecção activa, apresentam uma média da taxa de reactivação ligeiramente mais baixa, com cerca de 29,78% (17-39,7%) (30, 82, 182, 183).

Nesta investigação, a infecção activa por CMV ocorreu em média 16 dias após o internamento do doente com sépsis, determinada pela média dos dias da primeira amostra de cada doente com presença do ADN do CMV. O acompanhamento dos doentes continuou após a sua transferência da UCI para outros serviços hospitalares. Como tal, o período de reactivação do CMV de 16 dias pode ser comparado com o de 24,5 dias obtido por Heininger e colaboradores (73), com o mesmo desenho de estudo e técnica de detecção do vírus, embora em doentes apenas com diagnóstico de sépsis grave. Se a análise incluir apenas os doentes que reactivaram o CMV durante o seu internamento na UCI, a reactivação ocorre nas duas primeiras semanas de internamento, tal como concluíram dois estudos realizados pela mesma equipa, embora com técnicas de detecção diferentes (182, 183), em doentes diagnosticados com choque séptico.

A classificação de gravidade do estado clínico do doente – APACHE II – não foi relacionada com a reactivação do CMV e, embora seja um resultado concordante com Kutza e colaboradores (98), a pequena amostragem desta investigação poderá ter condicionado estes resultados e os que serão discutidos seguidamente. Quando

analisando doentes com um quadro mais grave de sépsis – choque séptico – não existe consenso na relação do sistema de classificação e reactivação (20, 182, 183).

Muitos estudos em doentes internados na UCI (34, 82, 104, 189) e em alguns casos, mais concretamente, doentes diagnosticados com sépsis (73) ou choque séptico (186), sugeriram que a reactivação do CMV nos doentes condiciona o tempo de permanência na UCI, aumentando o período de internamento neste serviço hospitalar. Contudo, na presente investigação não foi detectada qualquer relação entre a presença do vírus e a duração da permanência na UCI. No entanto, se se tiver em conta todo o período de internamento hospitalar, desde a entrada na UCI até a alta hospitalar ou morte do doente, foi encontrada uma diferença significativa entre os doentes com e sem reactivação do CMV (respectivamente 30 e 17 dias), à semelhança de outros estudos realizados em doentes com quadros mais graves de sépsis (73, 24) ou em doentes de uma UCI cirúrgica (34).

A necessidade de ventilação mecânica durante o internamento tem sido muito associada à reactivação do CMV, sendo que estes doentes com ocorrência de reactivação têm maior duração de ventilação assistida (34, 82, 182, 183). Vários ensaios (31, 73) estudaram a presença do CMV não só no sangue mas também em lavados broncoalveolares, tendo sido o vírus detectado mais precocemente nestes últimos. Brenner e colaboradores (24) também estudaram a presença de CMV em secreções da traqueia e no sangue, tendo sido detectado em mais amostras de secreções da traqueia que no sangue, onde apenas 9 dos 12 doentes apresentaram resultados positivos em ambos os tipos de amostras estudadas. Na presente investigação, embora 7 (87,5%) dos doentes com reactivação tenham necessitado de ventilação mecânica, opondo-se aos 9 (64,3 %) dos doentes sem reactivação, não foi encontrada uma diferença significativa na necessidade e duração da ventilação mecânica entre estes dois grupos de doentes.

Não se obteve qualquer relação entre a morte do doente e a reactivação, à semelhança de outros estudos (31, 73, 182).

Limaye e colaboradores (104) determinaram em doentes da UCI, que a carga viral do CMV pode fortemente influenciar o quadro clínico do doente, chegando à mesma conclusão outros autores que estudaram a reactivação do CMV num grupo de doentes internados da UCI (20). A infecção nestes estudos foi estabelecida pela presença de ADN de CMV em amostras de plasma, sendo que doentes com cargas virais mais altas

(>1000 cópias de ADN de CMV por ml) apresentavam um quadro clínico mais grave, nomeadamente um maior tempo de internamento hospitalar e uma maior taxa de mortalidade. Na tentativa de encontrar uma semelhante relação no que diz respeito a doentes diagnosticados com sépsis, procedeu-se também à comparação dos quadros clínicos dos doentes com reactivação do CMV com cargas superiores e inferiores a 1000 cópias de ADN de CMV por ml. Mas com apenas três doentes com carga superior a 1000 cópias/ml não se obteve qualquer relação na necessidade e duração da ventilação mecânica, no tempo de internamento na UCI e no hospital e na mortalidade nestes. Quando se relacionou o pico da carga viral obtida por cada doente com reactivação do CMV com o quadro clínico do doente ao longo do seu internamento, nenhuma relação foi encontrada, embora os doentes que faleceram apresentassem uma tendência para um maior número de cópias de ADN/ml, mas sem diferença significativa, como também o comprovaram Chilet e colaboradores (31).

Durante a sépsis ocorre a libertação de citocinas desencadeando todo um processo pro e anti-inflamatório, em parte responsável pela evolução do quadro clínico do doente (60). Neste estudo fez-se a pesquisa de nove citocinas – IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e IFN- γ – escolhidas, à semelhança de outros estudos, por todas estarem implicadas em algum momento do processo inflamatório (23, 115). Algumas destas citocinas não foram detectadas em nenhum dos doentes (IL-2), ou apenas foram detectadas em menos de 50% dos doentes (IL-1 α e IFN- γ). As restantes citocinas apresentaram, nos doentes diagnosticados com sépsis, concentrações mais elevadas que no grupo de controlo, demonstrando a existência destas citocinas em concentrações mais elevadas na ocorrência de um processo inflamatório, como está descrito na literatura (126, 174). Ao longo das duas primeiras semanas de internamento, detectou-se uma diminuição significativa da concentração da IL-6 e da IL-10 nestes doentes.

Embora exista esta produção significativa de citocinas nos doentes com processo inflamatório, não se detectou nenhuma relação entre as citocinas e o tempo de internamento na UCI e no hospital, e o tempo de duração da ventilação mecânica. Em alguns estudos os sistemas de classificação de gravidade da doença e a morte do doente são correlacionados com citocinas, nomeadamente com as IL-6, IL-8 e TNF- α (23, 39, 115), o que não aconteceu na presente investigação, embora se detectassem, sem

diferença significativa, concentrações superiores da IL-6 e IL-8 nos doentes que não sobreviveram. Os doentes que faleceram apresentaram um quadro clínico mais grave, contudo apenas a relação entre o sistema de classificação APACHE II e a falência de um ou mais órgãos foi significativa, sendo que doentes com falência de um ou mais órgãos têm uma classificação APACHE II mais elevada ($p < 0,05$).

Embora a IL-10 seja uma citocina anti-inflamatória, em que a principal função é a de inibir a produção de citocinas pro-inflamatórias (129), foi encontrada durante o estudo uma correlação significativa positiva entre a IL-10 e o TNF- α (à entrada do estudo), e a IL-10 com a IL-6 e a IL-8 (ambas após duas semanas de internamento) corroborando assim outros autores que realizaram estudos com doentes com quadros mais graves de sépsis e choque séptico, que também detectaram uma correlação positiva entre estas citocinas (54, 61, 103). Também foi encontrada uma moderada correlação entre uma citocina anti-inflamatória, IL-4, e uma pro-inflamatória, IL-8; deve, no entanto, ser referido que o papel da IL-4 em infecções sistémicas não é ainda claro (129).

Várias destas citocinas estudadas têm sido apontadas como possíveis responsáveis pela reactivação do CMV num quadro de sépsis, sendo que ao serem libertadas em resposta à infecção, activam o NF- κ B, que por sua vez permite a expressão dos genes virais e, consequentemente, um ciclo viral completo (35). Também tem sido referido a importância destas citocinas, nomeadamente a TNF- α em doentes com transplantação de medula óssea (142).

No presente estudo, não foi observada qualquer alteração nos doentes com processo inflamatório tendo em conta a reactivação do CMV, à entrada ou durante o internamento dos doentes com e sem reactivação do vírus, em semelhança com o determinado por Brenner e colaboradores (24), que determinaram não haver diferença significativa entre a IL-6 e o TNF- α entre os doentes com e sem reactivação. Também Kutza e colaboradores (98) não observaram qualquer diferença entre a IL-1 β e a IL-6, embora tenham relatado uma diferença significativa na concentração do TNF- α entre os doentes com e sem reactivação do CMV.

Na evolução das duas primeiras semanas de internamento não foi detectada nenhuma alteração significativa na concentração das citocinas nos doentes com reactivação,

sendo que todas as citocinas apresentaram uma diminuição da concentração, exceptuando a IL-8. Se considerarmos o período destes doentes desde a entrada até à sua última amostra colhida, ou seja, se avaliarmos todo o internamento para além das duas semanas, nomeadamente nos doentes que reactivaram o CMV após as duas semanas, também é a IL-8 a citocina que aumenta a sua concentração, embora sem nenhuma diferença significativa. A permanência desta citocina ao longo do internamento do doente e, em alguns casos, o aumento da sua concentração no mesmo período de tempo, poderá ser consequência da indução da produção desta citocina pelo CMV (121).

Para determinar se a presença de alguma das citocinas estudadas influencia ou é influenciada pela reactivação do CMV, compararam-se as concentrações das citocinas nas amostras de maior e menor carga, e no intervalo de uma ou duas semanas antes do episódio de reactivação, não se tendo verificado nenhuma diferença significativa. Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior, onde não foi detectada uma diferença no TNF- α com a reactivação do CMV (31). Nas amostras de maior carga viral existe um aumento da IL-6 e da IL-8, o que poderá ser explicado ou pelo efeito do sistema imune do doente em resposta ao vírus, ou pela presença do próprio vírus, sendo que em alguns estudos *in vitro* referem que o CMV induz a produção destas duas citocinas (3, 26, 121).

Foram realizadas, no presente estudo, as pesquisas de ADN de CMV por duas técnicas de PCR em tempo real, uma técnica *in house* e outra comercial. Embora possuíssem uma boa correlação, o número de cópias detectado pela técnica comercial foi significativamente superior ao detectado pela técnica *in house*. Após ajustamento da técnica *in house*, através do acerto da concentração do padrão utilizado nesta técnica, a correlação não só se manteve boa e significativa, como deixou de existir diferença entre estas duas técnicas.

Um doente foi incluído no estudo de comparação das técnicas de detecção de ADN de CMV no início da investigação, tendo obtido cargas virais elevadas logo à entrada do estudo (>90 000 cópias/ml). Contudo, o doente teve que ser posteriormente excluído na

análise dos doentes com processo inflamatório e com reactivação do CMV por se tratar de um indivíduo imunocomprometido.

Existem várias limitações na presente investigação que impossibilitaram a observação de dados estatisticamente significativos, nomeadamente a baixa amostragem, visto que apenas se conseguiu detectar tendências em alguns casos. Seria necessário alargar a amostra para um maior número de participantes, de forma a comprovar se as tendências observadas são de facto significativas e, se aumentando a amostragem, algumas das conclusões seriam concordantes com os estudos já existentes e com um maior número de participantes.

No entanto, apesar das limitações indicadas anteriormente, as conclusões obtidas estão em concordância com alguns estudos realizados com maiores amostragens. Estes estudos realizados até à data, em doentes internados em UCI, e mais concretamente em doentes diagnosticados com sépsis, não são concordantes em todos os dados avaliados. Os diferentes desenhos de estudo, as diferentes populações da UCI e as várias técnicas de detecção utilizadas, podem condicionar a discrepância dos resultados, tornando a infecção por CMV e o seu possível envolvimento no quadro clínico do doente, um assunto ainda muito controverso (105).

No presente estudo, e à semelhança dos mencionados até ao momento, embora se tenha detectado uma reactivação do vírus numa população de indivíduos com uma imunossupressão transitória, que condiciona o aumento do tempo de internamento do doente no hospital, essa reactivação não influenciou os restantes indicadores da evolução do quadro clínico dos doentes, nomeadamente a morte destes. Logo, a reactivação do CMV poderá ser apenas um sinal da imunossupressão transitória nestes doentes, não sendo considerada como agravante do seu estado clínico. Se se considerasse o CMV como agravante, a terapêutica antiviral teria indicações claras; no entanto, sem a presença de um estudo conclusivo sobre as consequências clínicas dos doentes com reactivação, não é recomendado o tratamento destes doentes com antivirais devido à sua toxicidade.

É de realçar que neste estudo foi possível observar uma concentração de citocinas elevadas aquando na presença de um processo inflamatório como a sépsis. Não se

verificaram, contudo, diferenças entre a concentração das citocinas nos doentes com e sem reactivação do CMV, como também não foi possível detectar nenhuma relação entre a concentração das citocinas e a presença do vírus. No entanto certas tendências foram observadas nos doentes com reactivação, como a produção contínua da IL-8, que poderá ser efeito da presença do vírus, conclusão a que chegaram outros estudos acima mencionados.

O presente estudo confirmou que a reactivação está presente neste grupo de doentes da UCI, condicionando o seu tempo de permanência no hospital. Contudo, não foram encontrados perfis específicos de citocinas antes e durante a reactivação.

5. Referências Bibliográficas

1. **Adler, S.P.** 1986. Molecular epidemiology of cytomegalovirus: evidence for viral transmission to parents from children infected at a day center. *Pediatr Infect Dis.* 5:315-8.
2. **Adler, S. P., J. W. Finney, A. M. Manganello, and A. M. Best.** 2004. Prevention of child-to-mother transmission of cytomegalovirus among pregnant women. *J Pediatr.* 45:485-491.
3. **Almeida, G. D., C. D. Porada, S. St Jeor, and J. L. Ascensao.** 1994. Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. *Blood.* 83(2):370-6.
4. **Arthurs, S. K., A. J. Eid, R. A. Pedersen, R. A. Dierkhising, W. K. Kremer, R. Patel, and R. R. Razonable.** 2007. Delayed-onset primary cytomegalovirus disease after liver transplantation. *Liver Transpl.* 13(12):1703-9.
5. **Bale, J. F., B. Zimmerman, J. D. Dawson, I. E. Souza, S. J. Petheram, and J. R. Murph.** 1999. Cytomegalovirus transmission in child care homes. *Arch. Pediatr. Adolesc.* 153:75-79
6. **Bale, J. F., L. Miner., and S. J. Petheram.** 2002. Congenital Cytomegalovirus Infection. *Current Treatment Options in Neurology.* 4:225-230.
7. **Barbi, M., S. Binda, V. Primache, S. Caroppo, P. Didò, P. Guidotti, C. Corbetta, and D. Melotti.** 2000. Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards: a powerful tool for diagnosing congenital infection. *J Clin Virol.* 17:159-65.
8. **Bego M. G., and S. St. Jeor.** 2006. Human cytomegalovirus infection of cells of hematopoietic origin: HCMV-induced immunosuppression, immune evasion, and latency. *Experimental Hematology.* 34:555-570
9. **Biron, K. K.** 2006. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 71(2-3): 154-63
10. **Blackwell, T. S., and J. W. Christman.** 1996. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth.* 77(1):110-117.
11. **Block, M. J., V. J. Goossens, S. J. V. Vanherle, B. Top, N. Tacken, J. M. Middeldorp, M. H. L. Christiaans, J. P. van Hooff, and C. A. Bruggeman.**

1998. Diagnostic value of monitoring Human Cytomegalovirus late pp67 mRNA expression in renal-allograft recipients by nucleic acid asequence-based amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(5): 1341-1346.
12. **Bodéus, M., and P. Goubau.** 1999. Predictive value of maternal-IgG avidity for congenital human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 12(1):3-8.
 13. **Boeckh M., and A. P. Geballe.** 2011. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*. 121(5):1673-80.
 14. **Boeckh, M, and G. Boivin.** 1998. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev*. 11(3):533-54.
 15. **Boehme, K.W., J. Singh, S. T. Perry, and T. Compton.** 2004. Human Cytomegalovirus elicits a coordinated cellular antiviral response via envelope glycoprotein B. *J Virol*. 78(3):1202-11.
 16. **Boehme K. W., and T. Compton.** 2006. Virus entry and activation of innate immunity, c.6, p.111-130. In M. J. Reddehase (ed), *Cytomegaloviruses: molecular biology and immunology*. Caister, Norfolk, United Kingdom.
 17. **Bolovan-Fritts, C. A., E. S. Mocarski, and J. A. Wiedman.** 1999. Peripheral blood CD14+ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood*. 93(1):394-398
 18. **Boppana, S. B., L. B. Rivera, K. B. Fowler, M. Mach, and W. J. Britt.** 2001. Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity. *N Engl J Med*. 344(18):1366-71.
 19. **Boppana, S. B., K. B. Fowler, R. F. Pass, L. B. Rivera, R. D. Bradford, F. D. Lakeman, and W. J. Britt.** 2005. Congenital cytomegalovirus infection: association between virus burden in infancy and hearing loss. *J Pediatr*. 146(6):817-23.
 20. **Bordes, J., J. Maslin, B. Prunet, E. D'Aranda, G. Lacroix, P. Goutorbe, E. Dantzer, E. Meaudre.** 2011. Cytomegalovirus infection in severe burn patients monitoring by real-time polymerase chain reaction: A prospective study. *Burns*. 37(3): 434-9.
 21. **Bosmann, M., and P. A. Ward.** 2013. The inflammatory response in sepsis. *Trends Immunol*. 34(3):129-36.

22. **Boyle, K. A., R. L. Pietropaolo, and T. Compton.** 1999. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol.* 19(5):3607-13
23. **Bozza, F. A., J. I. Salluh, A. M. Japiassu, M. Soares, E. F. Assis, R. N. Gomes, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza.** 2007. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 11(2): R49.
24. **Brenner ,T., C. Rosenhagen, I. Hornig, K. Schmidt, C. Lichtenstern, M. Mieth, T. Bruckner, E. Martin, P. Schnitzler, S. Hofer, and M. A. Weigand.** 2012. Viral infections in septic shock (VISS-trial)-crosslinks between inflammation and immunosuppression. *J Surg Res.* 176(2): 571-582.
25. **Browne, B. J., J. Young, T. B. Dunn and A. J. Matas.** 2010. The impact of cytomegalovirus infection ≥ 1 year after primary renal transplantation. *Clin Transplant.* 2010 ; 24(4): 572–577.
26. **Carlquist, J. F., L. Edelman, D. W. Bennion, and J. L. Anderson.** 1999. Cytomegalovirus induction of interleukin-6 in lung fibroblasts occurs independently of active infection and involves a G protein and the transcription factor, NF-kappaB. *J Infect Dis.* 179(5):1094-100.
27. **Chee, M.S., A. T. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. M. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. A. 3rd. Hutchison, T. Kouzarides, J. A. Martignettit et al.** 1990. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 154:125–169.
28. **Cheeran, M. C., J. R. Lokensgard, M. R. Schleiss.** 2009. Neuropathogenesis of congenital cytomegalovirus infection: disease mechanisms and prospects for intervention. *Clin Microbiol Rev.* 22(1):99-126.
29. **Cheung, A. K. L., A. Abendroth, A. L. Cuningham, and B. Slobedman.** 2006. Viral gene expression during the establishment of human cytomegalovirus latent infection in myeloid progenitor cells. *Blood.* 108(12):3691-3699
30. **Chiche, L., J. M. Forel, A. Roch, C. Guervilly, V. Pauly, J. Allardet-Servent, M. Gainnier, C. Zandotti, and L. Papazian.** 2009. Active cytomegalovirus infection is common in mechanically ventilated medical intensive care unit patients. *Crit Care Med.* 37(6): 1850-1857.

31. **Chilet, M, G. Aguilar, I. Benet, J. Belda, N. Tormo, J. A. Carbonell, M. A. Clari, E. Costa, and D. Navarro.** 2010. Virological and immunological features of active cytomegalovirus infection in nonimmunosuppressed patients in a surgical and trauma intensive care unit. *J Med Virol.* 82(8):1384-91.
32. **Cohen, J.** 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420:885-91.
33. **Compton, T., E. A. Kurt-Jones, K. W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D. T. Golenbock, and R. W. Finberg.** 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol.* 77(8):4588-96.
34. **Cook, C. H., L. C. Martin, J. K. Yenchar, M. C. Lahm, B. McGuinness, E. A. Davies, and R. M. Ferguson.** 2003. Occult herpes family viral infections are endemic in critically ill surgical patients. *Crit Care Med.* 31(7):1923-9.
35. **Cook, C. H., J. Trgovcich, P. D. Zimmerman, Y. Zhang, and D. D. Sedmak.** 2006. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor alpha, or interleukin-1 β triggers reactivation of latent cytomegalovirus in immunocompetent mice. *J Virol.* 80:9151-8.
36. **Coonrod, D., A. C. Collier, R. Ashley, T. DeRouen, and L. Corey.** 1998. Association between cytomegalovirus seroconversion and upper genital tract infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a prospective study. *The Journal of Infectious Diseases.* 177:1188–1193.
37. **Crough, T., and R. Khanna.** 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev.* 22:76-98.
38. **Cukuranovic, J., S. Ugrenovic, and I. Jovanovic.** 2012. Viral infection in renal transplant recipients. *The Scientific World Journal.* 2012
39. **Damas P., D. Ledoux, M. Nys, Y. Vrindts, D. De Groote, P. Franchimont, and M. Lamy.** 1992. Cytokine Serum Level During Severe Sepsis in Human IL-6 as a Marker of Severity . *Ann Surg.* 215(4): 356–362.
40. **DeMerritt, I. B., L. E. Milford, and A. D. Yurocho.** 2004. Activation of the NF-kB Pathway in Human Cytomegalovirus-Infected Cells Is Necessary for Efficient Transactivation of the Major Immediate-Early Promoter. *Journal of Virology.* 78(9):4498-4507.

41. **Deyi , M., P. Goubau, and M. Bodéus.** 2000. False-positive IgM antibody tests for cytomegalovirus in patients with acute Epstein-Barr virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19(7):557-60.
42. **Diagnóstico Precoce, Programa Nacional Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.** Disponível em <http://www.diagnosticoprecoce.org/index.htm> consultado dia 14 de Março.
43. **Drew, W. L., C. V. Paya, and V. Emery.** 2001. Cytomegalovirus (CMV) resistance to antivirals. *American Journal of Transplantation.* 1:307-312.
44. **Dropulic, L. K.** 2006. The impact of Cytomegalovirus infection solid organ transplantation. *Adv Stud Med.* 6(7):319-328.
45. **Dunn, W., C. Chou, H. Li., R. Hai., D. Patterson, V. Stolc, H. Zhu, and F. Liu.** 2003. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100(24):14223–14228
46. **Emery, V.** 2011. Investigation of CMV disease in immunocompromised patients. *J Clin Pathol.* 54:84–88.
47. **Erice, A., M. A. Holm, P. C. Gill, S. Henry, C. L. Dirksen, D. L. Dunn, Robyn P. Hilliam, and H. H. Balfour.** 1992. Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes. *Journal of Clinical Microbiology.* 30(11):2922-2925.
48. **Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. 3RD Cockerill, and T. F. Smith.** 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol (1):*165-256.
49. **Fishman, J. A., and R. H. Rubin.** 1998 Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med.* 338(24):1741-1751.
50. **Florescu D. F., A. C. Kalil.** 2011. Cytomegalovirus infections in non-immunocompromised and immunocompromised patients in the intensive care unit. *Infectious Disorders – Drug Targets.* 11: 354-364.
51. **Florescu, D. F., A. N. Langnas, W. Grant, D. F. Mercer, J. Botha, F. Qiu, L. Shafer, and A. C. Kalil.** 2012. Incidence, risk factors, and outcomes

- associated with cytomegalovirus disease in small bowel transplant recipients. *Pediatr Transplant*. 16(3):294-301.
52. **Fowler, K. B., S. Stagno, R. F. Pass, W. J. Britt, T. J. Boll, and C. A. Alford.** 1992. The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med*. 326(10):663-7.
 53. **Fowler, K. B., and S. B. Boppana.** 2006. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit. *J Clin Virol*. 35(2):226-31.
 54. **Friedman, G, S. Jankowski, A. Marchant, M. Goldman, R. J. Kahn, and J. L. Vincent.** 1997 Blood interleukin 10 levels parallel the severity of septic shock. *J Crit Care*. 12(4):183-7.
 55. **Gamadia, L. E., E. B. Remmerswaal, J. F. Weel, F. Bemelman, R. A. van Lier, and I. J. Ten Berge.** 2003. Primary immune responses to human CMV: a critical role for IFN-gamma-producing CD4+ T cells in protection against CMV disease. *Blood*. 101(7):2686-92.
 56. **Gandhi, M.K., and R. Khanna.** 2004. Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments. *Lancet Infect Dis*. 4(12):725-38.
 57. **Gicklhorn, D., M. Eickmann, G. Meyer, M. Ohlin and K. Radsak.** 2003. Differential effects of glycoprotein B pepitope-specific antibodies on human cytomegalovirus-induced cell–cell fusion. *Journal of Gen Virology*. 84:1859–62.
 58. **Gilbert, C., G. Boivin.** 2005. Human Cytomegalovirus resistance to antiviral drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(3):873-883.
 59. **Gleaves, C.A., T. F. Smith, E. A. Shuster, and G. R. Pearson.** 1984. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol*. 19(6):917-9.
 60. **Gogos, C. A., E. Drosou, H. P. Bassaris, A. Skoutelis.** 2000. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis*. 181(1):176-80.
 61. **Gómez-Jiménez, J., M. C. Martín, R. Sauri, R. M. Segura, F. Esteban, J. C. Ruiz, X. Nuvials, J. L. Bóveda, R. Peracaula, and A. Salgado.** 1995.

- Interleukin-10 and the monocyte/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis.* 171(2):472-5.
62. **Graça, A., C. Silvério, J. P. Ferreira, A. Brito, S. Almeida, P. Paixão, and L. Pinheiro.** 2004. Citomegalovirus, Infecção congénita ou neonatal?. *Acta Méd Port.* 17:335-340
 63. **Grangeot-Keros, L., M. J. Mayaux, P. Lebon, F. Freymuth, G. Eugene, R. Stricker, and E. Dussaix.** 1997. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women. *J Infect Dis.* 175(4):944-6.
 64. **Grangeot-Keros, L., D. Cointe.** 2001. Diagnosis and prognostic markers of HCMV infection. *Journal of Clinical Virology.* 21: 213-221.
 65. **Griffiths P. D., and J. E. Grundy.** 1987. Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *J. Biochem.* 241:313-324.
 66. **Guerra, B., G. Simonazzi, C. Puccetti, M. Lanari, A. Farina, T. Lazzarotto, and N. Rizzo.** 2008. Ultrasound prediction of symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Am J Obstet Gynecol.* 198(4):380.e1-7.
 67. **Hamprecht, K., J. Maschmann, M. Vochem, K. Dietz, C. P. Speer, G. Jahn.** 2001. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet.* 357(9255):513-8.
 68. **Hamprecht, K., R. Goelz, and J. Maschmann.** 2005. Breast milk and cytomegalovirus infection in preterm infants. *Early Human Development.* 81:989-96.
 69. **Harari, A, S. C. Zimmerli, G. Pantaleo.** 2004. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Hum Immunol.* 65(5):500-6.
 70. **Hegde, N. R., C. Dunn, D. M. Lewinsohn, M. A. Jarvis, J. A. Nelson, and D. C. Johnson.** 2005. Endogenous human cytomegalovirus gB is presented efficiently by MHC class II molecules to CD4⁺ CTL. *The Journal of Experimental Medicine.* 202(8):1109-1119
 71. **Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak, and P. M. Williams.** 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10):986-94.

72. **Heininger, A., G. Jahn, C. Engel, T. Notheisen, K. Unertl, and K. Hamprecht.** 2001. Human Cytomegalovirus infections in nonimmunosuppressed critically ill patients. *Crit Care Med.* 29:541-7.
73. **Heininger, A. H. Haeberle, I Fischer, R. Beck, R. Riessen, F. Rohde, C. Meisner, G. Jahn, A. Koenigsrainer, K. Unertl, and K. Hamprecht.** 2011. Cytomegalovirus reaction and associated outcome of critically ill patients with severe sepsis. *Critical Care.* 12: R77.
74. **Ho, M.** 2008. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol.* 197:65-73.
75. **Hotchkiss, R., and I. E. Karl.** 2003. *The New England Journal of Medicine.* 348: 138-150.
76. **Hoz, R. E., G. Stephens, C. Sherlock.** 2002. Diagnosis and treatment approaches of CMV infections in adult patients. *J Clin Virol.* 25: S1-S12.
77. **Humar, A., C. Paya, M. D. Pescovitz, E. Dominguez, K. Washburn, E. Blumberg, B. Alexander, R. Freeman, N. Heaton, and B. Mueller.** 2004. Clinical utility of cytomegalovirus viral load testing for predicting CMV disease in D+/R- solid organ transplant recipients. *Am J Transplant.* 4(4):644-9.
78. **Humar, A., D. Snyderman, and AST Infectious Diseases Community of Practice.** 2009. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation.* 9(Suppl4):S78–S86.
79. **Hummel, M., Z. Zhang, S. Yan, I. DePlaen, P. Golia, T. Varghese, G. Thomas, and M. I. Abecassis.** 2001. Allogeneic transplantation induces expression of cytomegalovirus immediate-early genes in vivo: a model for reactivation from latency. *J Virol.* 75:4814–4822.
80. **Hummel, M., M. M. Abecassis.** 2002. A model for reactivation of CMV from latency. *Journal of Clinical Virology.* 25: S123-S136.
81. **Isomura, H., and F. Stinski.** 2003. The Human Cytomegalovirus Major Immediate-Early Enhancer Determines the Efficiency of Immediate-Early Gene Transcription and Viral Replication in Permissive Cells at Low Multiplicity of Infection. *Journal of Virology.* 77(6):3602-3614.

82. **Jaber, S., G. Chanques, J. Borry, B. Souche, R. Verdier, P. Perrigault and J. Eledjan.** 1995. Cytomegalovirus infection in critically ill patients. *CHEST*. 127:233–241.
83. **Jain, M., S. Duggal, and T. D. Chugh.** 2011. Cytomegalovirus infection in non-immunosuppressed critically ill patients. *J Infect Dev Ctries*. 5(8):571-579
84. **Jarvis, M. A. and J. A. Nelson.** 2007. Human Cytomegalovirus Tropism for Endothelial Cells: Not All Endothelial Cells Are Created Equal. *Journal of virology*. 81(5):2095–2101.
85. **Jenkins, F. J., D. T. Rowe, and C. R. Rinaldo.** 2003. Herpesvirus infections in organ transplant recipients. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 10(1):1-7.
86. **Joseph, S. A., C. Béliveau, C. J. Muecke, E. Rahme, J. C. Soto, G. Flowerdew, L. Johnston, D. Langille, and T. W. Gyorkos.** 2006. Cytomegalovirus as an occupational risk in daycare educators. *Paediatr Child Health*. 11(7):401-7.
87. **Kalejta, R. F.** 2008. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol*. Jun;72(2):249-65.
88. **Kalil, A. C., and D. F. Florescu.** 2011. Is Cytomegalovirus reactivation increasin the mortality of patients with severe sepsis. *Crit Care*. 15(2): 138.
89. **Karavellas, M. P., D. J. Plummer, J.C. Macdonald, F. J. Torriani, C. L. Shufelt, S. P. Azen, and W.R. Freeman.** 1999. Incidence of immune recovery vitritis in cytomegalovirus retinitis patients following institution of successful highly active antiretroviral therapy. *Journal of Infectious Diseases*. 179:697–700
90. **Keh, W. C., and M. A. Gerber.** 1988. In situ hybridization for cytomegalovirus DNA in AIDS patients. *Am J Pathol*. 131(3):490-6.
91. **Kenneson, A., and M. L. Cannon.** 2007. Reviem and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev. Med. Virol*. 17:253-276
92. **Khan, N.** 2007. The immunological burden of human cytomegalovirus infection. *Arch. Immunol. Ther. Exp*. 55:299-308.
93. **Kinzler, E.R., T.Compton.** 2005.Characterization of Human Cytomegalovirus Glycoprotein-Induced Cell-Cell Fusion. *J Virol*. 79(12): 7827–7837.

94. **Kirubakaran, S. I.**, 2004. Update: Cytomegalovirus infection in HIV-Infected patients – a review. *Clinical Microbiology Newsletter*. 26(28):137-144.
95. **Knaus, W. A., E. A. Draper, D. P. Wagner, and J. E. Zimmerman**. 1985. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 13(10):818-29.
96. **Kotton, C. N., and J. A. Fishman**. 2005. Viral infection in renal transplant recipient. *J Am Soc Nephrol*. 16:1758–1774.
97. **Kumar, S., D. J. Leaper**. 2005. Basic science of sepsis. *Surgery Journal*. 23(8): 272-277.
98. **Kutsa, S. S., E. Muhl, H. Hackstein, H. Kirchner, and G. Bein**. 1998. High incidence of active Cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis*. 26: 1076-1782.
99. **Landolfo, S., M. Gariglio, G. Gribaudo, and D. Lembo**. 2003. The human cytomegalovirus. *Pharmacol Ther*. 98:269-97.
100. **Lazzarotto, T., P. Spezzacatena, P. Pradelli, D. A. Abate, S. Varani, and M. P. Landini**. 1997. Avidity of immunoglobulin G directed against human cytomegalovirus during primary and secondary infections in immunocompetent and immunocompromised subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*. 4(4):469-73.
101. **Lazzarotto, T., B. Guerra, M. Lanari, L. Gabrielli, and M. P. Landini**. 2008. New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol*. 41(3):192-7.
102. **Lee, J., and G. J. Burckart**. 1998. Nuclear factor kappa B: Important transcription factor and therapeutic target. *J. Clin. Pharmacol*. 38:981-993.
103. **Lehmann, A. K., A. Halstensen, S. Sørnes, O. Røkke, and A. Waage**. 2005. High Levels of Interleukin 10 in Serum Are Associated with Fatality in Meningococcal Disease. *Infection and immunity*. 63(6):2109–2112.
104. **Limaye, A. P., K. A. Kirby, G. D. Rubenfeld, W. M. Leisenring, E. M. Bulger, M. J. Neff, N. S. Gibran, M. L. Huang, T. K. Santo Hayes, L. Corey, and M. Boeckh**. 2008. Cytomegalovirus reactivation in critically ill immunocompetent patients. *JAMA*. 300(4): 413-22.
105. **Limaye, A. P., and M. Boeckh**. 2010. CMV in critically ill patients: pathogen or bystander? *Rev Med Virol*. 20(6):372-9.

106. **Ljungman, P.** 2007. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: viral status. *Best Pract Res Clin Haematol.* 20(2):209-17.
107. **Lopo, S, E. Vinagre, P. Palminha, M. T. Paixao, P. Nogueira, and M. G. Freitas.** 2011. Seroprevalence to cytomegalovirus in the Portuguese population, 2002-2003. *EuroSurveill.* 16(25)
108. **Löser, P., G. S. Jennings, M. Strauss, and V. Sandig.** 1998. Reactivation of the previously silenced cytomegalovirus major immediate-early promoter in the mouse liver: involvement of NFkappaB. *J Virol.* 72(1): 180-90.
109. **Lurain, N. S., S. Chou.** 2010. Antiviral drug resistance of human cytomegalovirus. *Clin Microbiol Rev.* 23(4):689-712.
110. **Malm, G., and M. Engman.** 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Fetal & Neonatal Medicine.* 12:154-159.
111. **Marshall, B. C., and S. P. Adler.** 2009. The frequency of pregnancy and exposure to cytomegalovirus infections among women with a young child in day care. *Am J Obstet Gynecol.* 200:163.e1-163.e5
112. **Mattes, F.M., J. E. McLaughlin, V. C. Emery, D. A. Clark, and P. D. Griffiths.** 2000. Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for cytomegalovirus in the era of human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Pathol.* 53(8):612-4.
113. **Mazzulli, T., L. W. Drew, B. Yen-Lieberman, D. Jekic-McMullen, D. J. Kohn, C. Isada, G. Moussa, R. Chua, and S. Walmsley.** 1999. Multicenter comparison of the digene hybrid capture CMV DNA assay (version 2.0), the pp65 antigenemia assay, and cell culture for detection of cytomegalovirus viremia. *J Clin Microbiol.* 37(4):958-63.
114. **Mendelson, M., S. Monard, P. Sissons, and J. Sinclair.** 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *Journal of General Virology.* 77:3099-3102
115. **Mera, S., D. Tatulescu, C. Cismaru, C. Bondor, A. Slavcovic, V. Zanc, D. Carstina, and M. Oltean.** 2011. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS.* 119(2):155-63.
116. **Miller-Kittrell M., and T. E. Sparer.** 2009. Feeling manipulated: cytomegalovirus immune manipulation. *Virol J.* 6:4.

117. **Mocarski E. S., T. Shenk, and R. F. Pass.** 2007. Cytomegaloviruses, c.69, p.2703-2774. In Knipe D. M., P. M. Howley (5ed), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, PA
118. **Motta, V. N., and S. L. Martins.** 2008. Impairment of cytomegalovirus-specific cellular immune response as a risk factor for cytomegalovirus disease in transplant recipients. *Braz J Med Biol Res.* 41(1):5-11.
119. **Movassagh, M, J. Gozlan, B. Senechal, C. Baillou, J. C. Petit, F. M. Lemoine.** 1996. Direct infection of CD34+ progenitor cells by human cytomegalovirus: evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood.* 88(4):1277-83.
120. **Munro, S. C., B. Hall, L. R. Whybin, L. Leader, P. Robertson, G. T. Maine, and W. D. Rawlinson.** 2005. Diagnosis of an screening for Cytomegalovirus infection in pregnant women. *Journal of clinical Microbiology.* 43(9):4713-4718
121. **Murayama, T., N. Mukaida, K. S. Khabar, and K. Matsushima.** 1998. Potential involvement of IL-8 in the pathogenesis of human cytomegalovirus infection. *J Leukoc Biol.* 64(1):62-7.
122. **Murphy E., D. Yu, J. Grimwood, J. Schmutz, M. Dickson, M. A. Jarvis, G. Hahn, J. A. Nelson, R. M. Myers, and T. E. Shenk.** 2003. Coding potential of laboratory and clinical strains of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci USA.*100(25):14976-14981.
123. **Murray, B. M., J. Brentjens, D. Amsterdam, J. Myers, V. Gray, I. Pawlowski, K. Schewegler, J. P. Singh, and R. C. Venuto.** 1994. The cytomegalovirus-antigenemia assay in the diagnosis of posttransplant cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol.* 4(8):1615-22.
124. **Mustakangas, P., S. Sarna, P. Ammälä, M. Mutttilainen, P. Koskela, M. Koskiniemi.** 2000. Human cytomegalovirus seroprevalence in three socioeconomically different urban areas during the first trimester: a population-based cohort study. *Int J Epidemiol.* 29(3):587-91.
125. **Navarro, L., K. Mowen, S. Rodems, B. Weaver, N. Reich, D. Spector, and M. David.** 1998. Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response

- gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol.* 18(7):3796-802.
126. **Netea, M. G., J. W. van der Meer, M. van Deuren, and B. J. Kullberg.** 2003. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? *Trends Immunol.* 24:254-8.
 127. **Nigro, G., S. P. Adler, R. La Torre, A. M. Best.** 2005. Congenital Cytomegalovirus Collaborating Group. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection. *N Engl J Med.* 353(13):1350-62.
 128. **Ohlin, M. V. Sundqvist, M. Mach, B. Wahren, and C. A. K. Borrebarck.** 1993. Fine specificity of the human immune response to the major neutralization epitopes expressed on cytomegalovirus gp58/116 (gB), as determined with human monoclonal antibodies. *Journal of Virology.* 67(2):703-710.
 129. **Opal, S. M. and V. A. DePalo.** 2000. Anti-inflammatory cytokines. *Chest.* 117(4):1162-72.
 130. **Ornoy, A., and O. Diav-Citrin.** 2006. Fetal effects of primary and secondary cytomegalovirus infection in pregnancy. *Reprod Toxicol.* 21(4):399-409
 131. **Osawa , R., and N. Singh.** 2009. Cytomegalovirus infection in critically ill patients: a systematic review. *Critical Care.* 13(3): R68.
 132. **Paixão, P., S. Almeida, P. Gouveia, L. Vilarinho, and O. R. Vaz.** 2009. Prevalence of human cytomegalovirus congenital infection in Portuguese newborns. *Euro Surveill.* 14(9):13-5.
 133. **Paixão, P., S. Almeida, P. A. Videira, D. Ligeiro, and T. Marques.** 2012. Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. *Eur J Pediatr.* 171(1):125-9.
 134. **Patel, R., C. V. Paya.** 1997. Infections in Solid-Organ Transplant Recipients. *Clinical microbiology Reviews.* 10(1):86-124.
 135. **Paya, C. V.** 2001. Economic impact of cytomegalovirus in solid organ transplantation. *Transplant Infectious Diseases.* 3(s2):14-19.
 136. **Pereira, A.** 2011. SPSS – Guia prático de Utilização. Análise de dados para ciências sociais e psicologia. 7ed. Edições Sílabo, Lisboa.

137. **Pérez-Sola, M.J., J. J. Castón, R.Solana, A.Rivero, and J. Torre-Cisneros.** 2008. Indirect effects of cytomegalovirus infection in solid organ transplant recipients. *Enferm Inf Microbiol Clin.* 26:38-47.
138. **Pinsky, M. R., J. L. Vincent, J. Deviere, M. Alegre, R. J. Kahn, and E. Dupont.** 1993. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest.* 103(2):565-75
139. **Prösh, S., K. Staak, J. Stein, C. Liebenthal, T. Stamminger, H. Volk, and D. H. Krüger.** 1995. Stimulation of the Human Cytomegalovirus IE enhancer/promoter in HL-60 cells by TNF- α is mediated via induction of NF- κ B. *Virology.* 208:197-206
140. **Razonable, R. R., C. V. Paya, T. F. Smith.** 2002. Role of the laboratory in diagnosis and management of Cytomegalovirus infection in hematopoietic stem cell and solid-organ transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology.* 40(3): 746-752.
141. **Razonable, R. R.** 2010. Cytomegalovirus infection after liver transplantation. *Liver transplantation.* 16(s2):s45-s53.
142. **Reddy, V., H. U. Meier-Kriesche, S. Greene, J. D. Schold, and J. R. Wingard.** 2005. Increased levels of tumor necrosis factor alpha are associated with an increased risk of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11:698-705.
143. **Reeves, M. B., and T. Compton.** 2011. Inhibition of inflammatory Interleukin-6 activity via extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase signaling antagonizes human cytomegalovirus reactivation from dendritic cells. *Journal of Virology.* 85(23): 12750-12758.
144. **Revello, M. G., and G. Gerna.** 2002. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant. *Clin Microbiol Rev.* 15(4):680-715.
145. **Revello, M. G., and G. Gerna.** 2004. Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J Clin Virol.* 29(2):71-83.
146. **Rice, G. P. A., R. D. Schrier, and M. B. A. Oldstone.** 1984. Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 81:6134-6138.

147. **Riley, H. D. Jr.** 1997. History of the cytomegalovirus. *South Med J.* 90(2):184-90.
148. **Rosa, C., and D. J. Diamond.** 2012. The immune response to human CMV. *Future Virol.* 7:279-293.
149. **Ross, S. A., and S. B. Boppana.** 1994. Congenital Cytomegalovirus Infection: Outcome and Diagnosis. *Semin Pediatr Infect Dis.* 16:44-49.
150. **Ross, S.A., Z. Novak, S. Pati, and S. B. Boppana.** 2011. Overview of the diagnosis of cytomegalovirus infection. *Infect Disord Drug Targets.* 11(5):466-74.
151. **Schchetman, G., C. Ou, and W. K. Jones.** 1988. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases.* 158:1154-1157.
152. **Sester, M., U. Sester, B. Gärtner, B. Kubuschok, M. Girndt, A. Meyerhans, and H. Köhler.** 2002. Sustained high frequencies of specific CD4 T cells restricted to a single persistent virus. *J Virol.* 76(8):3748-55.
153. **Sester, M., U. Sester, B. C. Gärtner, M. Girndt, A. Meyerhans, and H. Köhler.** 2002. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol.* 13(10):2577-84.
154. **Sia I. G., J. A. Wilson, C. M. Groettu, M. J. Espy, T. F. Smith, and C. V. Paya.** 2000. Cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts relapsing CMV infection after solid organ transplantation. *J Infect Dis.* 181(2):717-20.
155. **Sinclair, J. H., J. Baillie, A. Bryant, J. A. Taylor-Wiedman, and J. G. P. Sissons.** 1992. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocyte cell line. *Journal of General Virology.* 73:433-435
156. **Sinclair, J., and P. Sissons.** 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *Journal of General Virology.* 87:1763-1779.
157. **Singh, K. P., J. L. Howard, S. P. Wild, S. L. Jones, J. Hoy, and S. R. Lewin.** 2007. Human cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cell responses are reduced in HIV-infected individuals with a history of CMV disease despite CD4+ T cell recovery. *Clin Immunol.* 124(2):200-6.
158. **Sinzger, C., A. Grefte, B. Plachter, A. S. Gouw, T. TH. and G. Jahn.** 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *Journal of General Virology.* 76:741-750.

159. **Sinzger, C., B. Plachter, A. Grefte, T. H. The, and G. Jahn.** 1996. Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *The Journal of Infectious Diseases.* 173:240-244
160. **Sissons, J. G., M. Bain, and M. R. Wills.** 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect.* 44(2):73-77
161. **Stagno, S., R. F. Pass, G. Cloud, W. J. Britt, R. E. Henderson, P. D. Walton, D. A. Veren, F. Page, and C. A. Alford.** 1986. Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA.* 256(14):1904-8.
162. **Stagno, S., and G. A. Cloud.** 1994. Working parents: The impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 91:2384-2389.
163. **Stinski, M. F.** 1978. Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus. Early and late virus-induced polypeptides. *Journal of Virology.* 26(3):686-701.
164. **Stinski, M. F., D. R. Thomsen, R. N. Stenberg, and L. C. Goldstein.** 1983. Organization and expression of the immediate early genes of Human Cytomegalovirus. *Journal of Virology.* 46(1):1-14.
165. **Stone, S. F., P. Price, and M. A. French.** 2006. Cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T cells in individuals with HIV infection: correlation with protection from CMV disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 57:585-88.
166. **Storch, G. A., R. S. Buller, T. C. Bailey, N. A. Ettinger, T. Langlois, M. Gaudreault-Keener, and P. L. Welby.** 1994. Comparison of PCR and pp65 antigenemia assay with quantitative shell vial culture for detection of Cytomegalovirus in blood leucocytes from solid-organ transplant recipients. *Journal of clinical microbiology.* 32(4): 997-1003.
167. **Tak, P.P., and G. S. Firestein.** 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest.* 107(1):7-11.
168. **Tavares, M. V., A. P. Domingues, M. Tavares, E. Malheiro, F. Tavares, and P. Moura.** 2011. Citomegalovírus, Existe Lugar para o rastreio durante a Gravidez?. *Acta Med Port.* 24(S4):1003-1008.

169. **Taylor-Wiedeman, J., J. G. P. Sissons, L. K. Borysiewicz, and J. H. Sinclair.** 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *Journal of general virology*. 72:2059-2064.
170. **Tomtishen, III J. P.** 2012. Human cytomegalovirus tegument proteins (pp65, pp71, pp150, pp28). *Virology Journal*. 9:22.
171. **Transmission - Cytomegalovirus (CMV) and Congenital CMV Infection.** Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em <http://www.cdc.gov/cmvt/transmission.html> consultada a 14 de Março de 2014.
172. **Treacher, D. F., and K. A. Brown.** 2009. The basic science of sepsis. *Surgery Journal*. 27: 465-469.
173. **Tsongalis, G. J.** 2006. Branched DNA technology in molecular diagnostics. *Am J Clin Pathol*. 126(3):448-53.
174. **Ulloa, L., and K. J. Tracey.** 2005. The "cytokine profile": a code for sepsis. *Trends Mol Med*. 11(2):56-63.
175. **Van der Bij, W., J. Schirm, R. Torensma, W. J. Van Son, A. M. Tegzess, T. H. The.** 1988. Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J Clin Microbiol*. 26(12): 2531-2535.
176. **Varani, S., and M. P. Landini.** 2011. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae*. 2:6.
177. **Varnum S.M., D. N. Streblow, M. E. Monroe, P. Smith, K. J. Auberry, L. Pasa-Tolic, D. Wang, D. G. Camp II, K. Rodland, S. Wiley, W. Britt, T. Shenk, R. D. Smith, and J. A. Nelson.** 2004. Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome. *J Virol*. 78(20):10960-6.
178. **Veal, N., C. Payan, D. Fray, L. Sarol, O. Blanchet, S. Kouyoumdjian, and F. Lunel.** 1996. Novel DNA assay for Cytomegalovirus detection: comparison with conventional culture and pp65 antigenemia assay. *Journal of clinical microbiology*. 34(12):3097-3100.
179. **Verbraak, F. D., R. Boom, D. P. M. Wertheim-van, G. J. van den Horn, A. Kijlstra, and M. D. de Smet.** 1999. Influence of highly active antiretroviral therapy on the development of CMV disease in HIV positive patients at high risk for CMV disease. *Br J Ophthalmol*. 83(10):1186-9.

180. **Virus Taxonomy: 2012 release – International Committee on Taxonomy of Viruses** disponível em <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> , consultado em 14 de Março de 2014.
181. **Vochem, M., K. Hamprecht, G. Jahn, and C. P. Speer.** 1998. Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Pediatr Infect Dis J.* 17(1):53-8.
182. **Von Muller, L., A. Klemm, M. Weiss, M. Schneider. H. Suger-Wiedeck, N. Durmus, W. Hampl, and T. Mertens.** 2006. Active Cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *Emerging Infectious Diseases.* 12(10): 1517-1522.
183. **Von Muller, L., A. Klemm, N. Durmus, M. Weiss, H. Suger-Wiedeck, M. Schneider, W. Hampl, and T. Mertens.** 2007. Cellular immunity and active Human Cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *The Journal of Infectious Diseases.* 196: 1288-1295.
184. **VonGlahn, W., A. M. Pappenheimer.** 1925. Intranuclear inclusions in visceral disease. *The American Journal of Pathology.* 1:5.
185. **Vries, J. C., E. Wessels, A. M. H. Korver, A. van der Eijk, L. G. Rusman, A. C. Kroes, and A. C. T. M. Vossen.** 2012. Rapid Genotyping of Cytomegalovirus in Dried Blood Spots by Multiplex Real-Time PCR Assays Targeting the Envelope Glycoprotein gB and gH Genes. *J. Clin. Microbiol.* 50(2):232.
186. **Walter, S., C. Atkinson, M. Sharland, P. Rice, E. Raglan, V. C. Emery, P. D. Griffiths.** 2008. Congenital cytomegalovirus: association between dried blood spot viral load and hearing loss. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 93(4):F280-5.
187. **Wreghitt, T.G., E. L. Teare, O. Sule, R. Devi, and P. Rice.** 2003. Cytomegalovirus infection in immunocompetent patients. *Clin Infect Dis.* 37(12):1603-6.
188. **Yan, S. T., and D. P. Fedorko.** 2002. Recent advances in laboratory diagnosis of human Cytomegalovirus infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews.* 2: 155-167.
189. **Ziemann, M., B. Sedemund-Adib, P. Reiland, P. Schmucker, and H. Hennig.** 2008. Increased mortality in long-term intensive care patients with active cytomegalovirus infection. *Crit Care Med.* 36:3145-3150.

6.ANEXOS

Anexo I – Consentimento Informado

Infecção activa pelo vírus citomegálico humano em doentes internados com sépsis numa Unidade de Cuidados Intensivos

FOLHA DE INFORMAÇÃO

O vírus citomegálico humano (CMV) tem sido descrito como um potencial factor de agravamento nas situações de sépsis, embora esta seja uma matéria sobre a qual ainda persistem muitas dúvidas.

No sentido de tentar esclarecer esta relação, a Faculdade de Ciências Médicas e o Hospital da Luz pretendem iniciar um estudo para o qual solicitavam a sua colaboração.

Neste estudo, seriam utilizadas amostras de sangue, colhidas para as análises de rotina durante o seu internamento, para a realização de umas análises especiais ligadas ao estudo. É importante realçar que não serão efetuadas colheitas de propósito para o estudo, mas sim será feito aproveitamento das amostras colhidas por rotina. Será para a realização destas análises que solicitamos a sua autorização e para que os resultados das mesmas possam ser utilizados para este estudo científico. Os dados obtidos com os seus resultados serão mantidos confidenciais, o que significa que se forem submetidos a publicação o anonimato dos doentes será mantido.

Poderá desistir do estudo a qualquer momento, se assim o entender.

**Infecção activa pelo vírus citomegálico humano em doentes internados com sépsis
numa Unidade de Cuidados Intensivos**

PROTOCOLO DE CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu abaixo assinado (nome completo)

....., declaro que autorizo a realização de análises ao sangue que vão avaliar a presença do vírus citomegálico humano e o grau de inflamação, com o objectivo de participar num estudo sobre a infecção activa pelo vírus citomegálico humano nos doentes com sépsis.

Fui informado que posso desistir do processo sempre que for essa a minha decisão, sem que daí resulte qualquer repercussão sobre o meu seguimento.

Os registos dos resultados poderão ser consultados pelos responsáveis científicos do Projecto de Investigação e ser objecto de publicação, mas os dados de carácter pessoal serão sempre considerados estritamente confidenciais

Lisboa / /

Assinatura:

Anexo II - Protocolo de Extracção do ADN utilizando o Kit de Purificação JetQuick® Genomic DNA, Genomed, Löhne, Alemanha.

A técnica deve ser executada segundo o protocolo de *MiniPrep*.

1. Antes de iniciar o protocolo prático, reconstituir os reagentes necessários:
 - a. Kx e K2 com etanol absoluto de acordo com as indicações nos rótulos dos reagentes, guardando os reagentes à temperatura ambiente;
 - b. Genomed Protease com água destilada até uma concentração final de 20mg/ml, guardando a -20°C.
2. Preparar as amostras dos doentes a analisar, colocando 200 µl da amostra num tubo de 1,5 ml.
3. Ligar o termobloco a 58°C;
4. Adicionar os reagentes pela ordem indicada ao todo de 1,5 ml que contém a amostra, agitando-o sempre no vortéx sempre que se colocar um novo reagente:
 - 1.º Genomed Protease – 20 µl
 - 2.º RNase A – 10 µl
 - 3.º Tampão Kx - 200 µl
5. Colocar o tubo com a mistura no termobloco a 58°C e incubar durante 10 minutos;
6. Adicionar 200 µl de Etanol 96-100% e agitar no vortex;
Observação: Agitar imediatamente no vortex de modo a prevenir a precipitação dos ácidos nucleicos.
7. Colocar a coluna JetQuick sobre o tubo de 2 ml, ambos fornecidos pelo kit.
8. Adicionar sobre a coluna a mistura anterior;
9. Centrifugar durante um minuto a 10,000 x g;
10. Descartar o líquido que se encontra no tubo de 2 ml;
11. Adicionar 500 µl de tampão Kx;
12. Centrifugar durante um minuto a 10,000 x g;
13. Descartar o líquido que se encontra no tubo de 2 ml e voltar a colocar a coluna sobre o tubo;
14. Adicionar 500 µl de tampão K2;
15. Centrifugar durante um minuto a 10,000 x g;
16. Descartar o líquido que se encontra no tubo de 2 ml e voltar a colocar a coluna sobre o tubo;
17. Centrifugar a coluna durante um minuto a 12 000 x g, para libertar a membrana de sílica de qualquer líquido residual;
18. Colocar a coluna sobre um novo tubo estéril de 1,5 ml;
19. Pré-aquecer a 50 µl de 10 mM Tris-HCl pH 8,5 a 70°C;
20. Adicionar na coluna e deixar durante 2 minutos à temperatura ambiente;
21. Centrifugar a coluna à temperatura ambiente a 10 000 x g durante 2 minutos para a eluição do ADN;
22. Para obter um mais ADN, efectuar uma segunda eluição para um novo tubo esterilizado, centrifugando a coluna de acordo com o passo anterior. Este passo é opcional;
23. O tubo de 1,5 ml possui ADN purificado. Descartar a coluna;
24. Guardar o ADN a -20°C.

Anexo III - Procedimento da PCR em Tempo Real utilizando o kit CMV HHV6,7,8 R-gene™ ref.:69-100

1. Utilizar para cada amostra e padrão a analisar uma mistura de amplificação consiste em 15 µl da premix R5 com 10 µl da amostra, tendo em conta que a premix de amplificação para o CMV (R5) está pronta a utilizar.
2. Realizar uma curva padrão utilizando quatro antígenios-padrão de quantificação – 2 500 (QS4), 25 000 (QS3), 250 000 (QS2) e 2 500 000 (QS1) cópias de CMV/ml.
Observação: Ter em conta que o valor atribuído a cada padrão dependerá do volume de extracção da amostra inicial (sangue total) e do volume da eluição final, neste caso 200 µl e 50 µl, respectivamente;
3. Utilizado um controlo negativo IC2W0, que resulta da extracção da água (W0) com o controlo interno IC2, ambos fornecidos pelo kit.
4. Após a preparação da placa, programar o aparelho de RT-PCR ABI PRISM 7500 (Applied Biosystem) com o seguinte programa de amplificação:
 - a. Activação da Taq Polimerase durante 15 minutos a 95°C;
 - b. 45 ciclos de desnaturação durante 10 segundos a 95°C e hibridação e extensão durante 40 segundos a 60°C.Observação: O Controlo IC2W0 será o único poço onde a leitura será efectuada a 530 e a 560 nm. As restantes serão todas a 530 nm.
5. Para os resultados serem validados, devem existir as seguintes condições:
 - Nenhum sinal de amplificação no IC2W0 a 530nm
 - Amplificação no IC2W0 a 560nm com CT igual ou inferior a 32 ciclos;
 - O Padrão QS3 deverá ter um valor de CT entre 30 e 35 ciclos;
 - O slope da curva padrão deverá ser superior a -3,917 e inferior a -3,103.

Anexo IV - Protocolo da técnica de ELISA Multiplex utilizando o Q-Plex™ Array Chemiluminescent

1. Reconstituir os reagentes necessários para o procedimento.
 - a) O Antígeno Padrão é reconstituído de acordo com cada kit específico. Neste caso o Antígeno foi reconstituído com 500µl de Diluente de Amostras. Após agitação da mistura, esta está pronta a ser utilizada.
 - b) A Solução de Lavagem deve ser reconstituída com 950 ml de Água Destilada para 50 ml de Solução de Lavagem;
 - c) Preparar uma curva padrão de oito pontos a partir do antígeno padrão, sendo que o ponto mais elevado da curva padrão corresponde ao antígeno padrão sem qualquer diluição. Os restantes seis pontos da curva serão diluições seriadas de 1:3 do antígeno padrão, sendo que o Diluente de Amostras constitui o último ponto ou ponto zero da curva padrão. Utilizar o Diluente das Amostras para as diluições, tal como é indicado na figura 3.

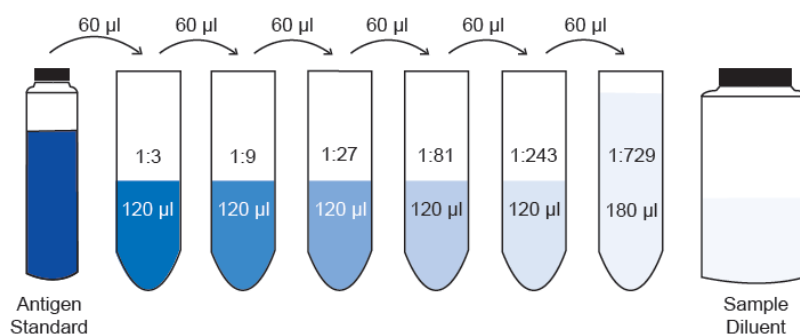


Figura 17 - Esquema das diluições seriadas do antígeno padrão

2. Proceder à preparação das amostras de soro, diluindo-as 1:2 com Diluente das Amostras;
Observações: A realização deste passo minimiza as interferências. Se é esperada uma elevada concentração de citocinas nas amostras, usar o Diluente de Amostras, de modo a diluir ainda mais as amostras.
3. Em cada poço adicionar 50 µl dos padrões e amostras
Observações: Não exceder os 10 minutos a colocar todos os padrões e amostras na placa.
4. Tapar a placa e colocá-la sobre um agitador horizontal durante uma hora à temperatura ambiente.
5. Proceder a três lavagens da placa, manuais ou automáticas. Para este protocolo as lavagens realizadas serão apenas de procedimento manual.
 - a) Após incubação, verter a placa para um recipiente próprio e agitar agressivamente de forma a não ficar retido qualquer vestígio de líquido na placa;
 - b) Colocar Solução de Lavagem num recipiente próprio para uma pipeta multicanal, com por exemplo, um pequeno tabuleiro;
 - c) Com auxílio de uma pipeta multicanal pipetar 200 a 300 µl de Solução de Lavagem em todos os poços da placa;

d) Verter o conteúdo da placa para um recipiente próprio e agitar vigorosamente de forma a não haver qualquer vestígio da Solução de Lavagem. Fica assim concluída a primeira lavagem;

e) Efectuar mais duas lavagens, repetindo os passos c) e d) duas vezes, sendo que na última lavagem assegurar que não permanece qualquer resíduo de Solução de Lavagem;

f) Se permanecer algum resíduo de solução de lavagem, verter a placa e agitar vigorosamente contra um papel de forma a remover qualquer excesso de Solução de Lavagem.

6. Após a lavagem da placa, adicionar o 50 µl de Anticorpo de Detecção a cada poço da placa.
7. Tapar a placa e colocá-la sobre um agitador horizontal durante uma hora à temperatura ambiente;
8. Após o tempo de incubação efectuar três lavagens, repetindo o processo efectuado no passo 6 do protocolo;
9. Após as lavagens, adicionar 50 µl de Estreptavidina HRP 1x em cada poço da placa;
10. Tapar a placa e colocá-la sobre um agitador horizontal durante quinze minutos à temperatura ambiente;
11. Após o tempo de incubação efectuar seis lavagens, repetindo o processo efectuado no passo 6 do protocolo;
12. Reconstituir o Substrato, adicionando num eppendorf 3 ml do Substrato A e 3 ml do Substrato B e agitá-lo de seguido;

Observações: O Substrato é sensível à luz, para tal deve-se proteger o Substrato, tentando minimizar a sua exposição à luz. Por exemplo, envolver o eppendorf em papel de alumínio.

13. Adicionar 50 µl do Substrato preparado no passo anterior em cada poço da placa;
14. No aparelho Chemidoc XRS capturar as imagens aos 30, 60, 90, 120 e 180 segundos;
15. Analisar as imagens obtidas no software Q-View.

Anexo V - Dados colhidos durante o estudo

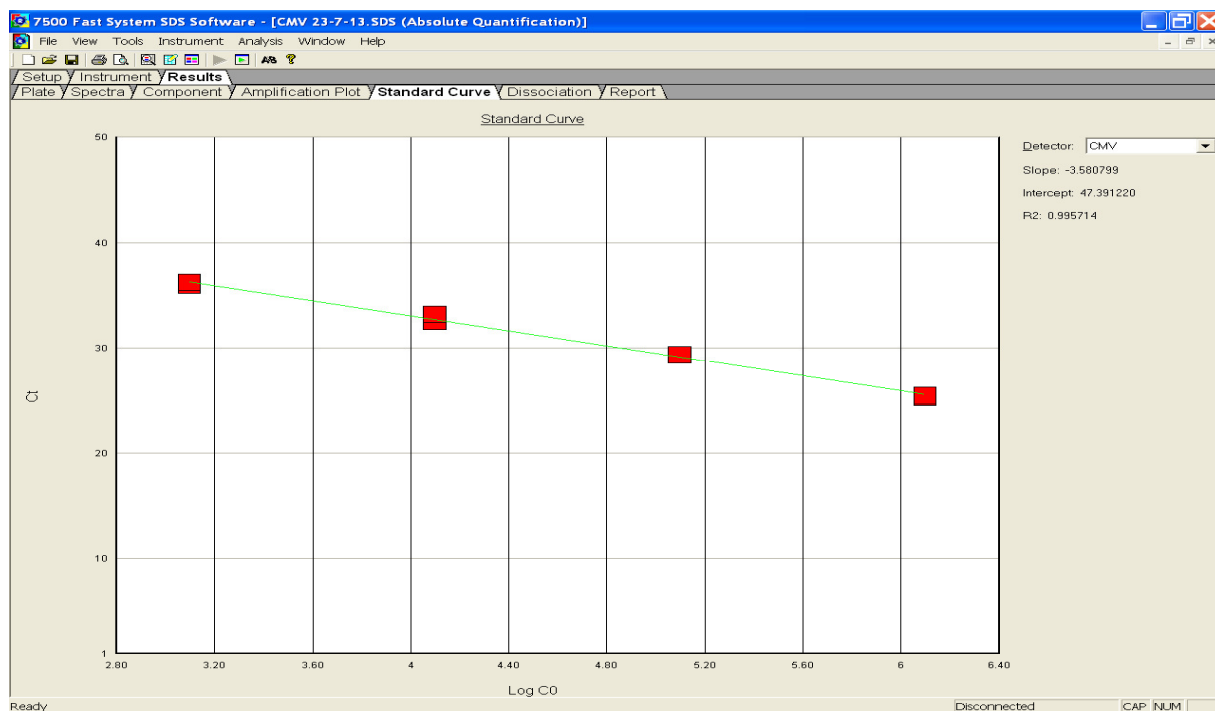
Doente	Género	Idade	APACHE II	Tempo de internamento hospitalar	Tempo de permanência na UCI	Ventilação Mecânica	Duração da Ventilação mecânica	Morte do Doente
1	Masculino	79	20	36	2,7	Sim	0,54	Não
3	Masculino	59	14	42	21,9	Sim	11,29	Não
4	Feminino	69	17	10	2,5	Sim	0,17	Não
5	Masculino	69	32	5	5,3	Sim	5,25	Sim
6	Masculino	81	34	9	9,6	Sim	8,5	-
8	Masculino	79	24	33	1,1	Não	-	Sim
10	Masculino	81	21	50	52,4	Sim	43,92	Sim
11	Masculino	65	25	19	6,9	Sim	4,58	Não
13	Feminino	56	20	17	5,3	Não	-	Não
14	Feminino	76	26	30	30,5	Sim	26,33	Sim
15	Masculino	85	30	31	11,1	Sim	8,33	Sim
16	Masculino	44	17	6	6,2	Não	-	Não
17	Feminino	84	14	32	3,5	Não	-	Sim
18	Feminino	45	16	18	9,7	Não	-	Não
19	Masculino	77	26	44	12,5	Sim	8,08	Não
20	Feminino	77	19	17	26,1	Sim	26,08	Não
21	Masculino	53	21	17	7,1	Sim	2,79	Não
22	Masculino	53	17	5	4,4	Sim	0,67	-
24	Masculino	73	20	28	22,5	Sim	10,38	Não
25	Feminino	57	18	13	2,7	Sim	0,63	Não
26	Masculino	70	22	7	7,1	Não	-	Não
27	Masculino	82	28	11	11,4	Sim	3,63	Sim

Anexo VI – Exemplo de resultados obtidos pelas técnicas de PCR em Tempo Real

1. Técnica Comercial CMV HHV6,7,8 R-gene™ ref.:69-100

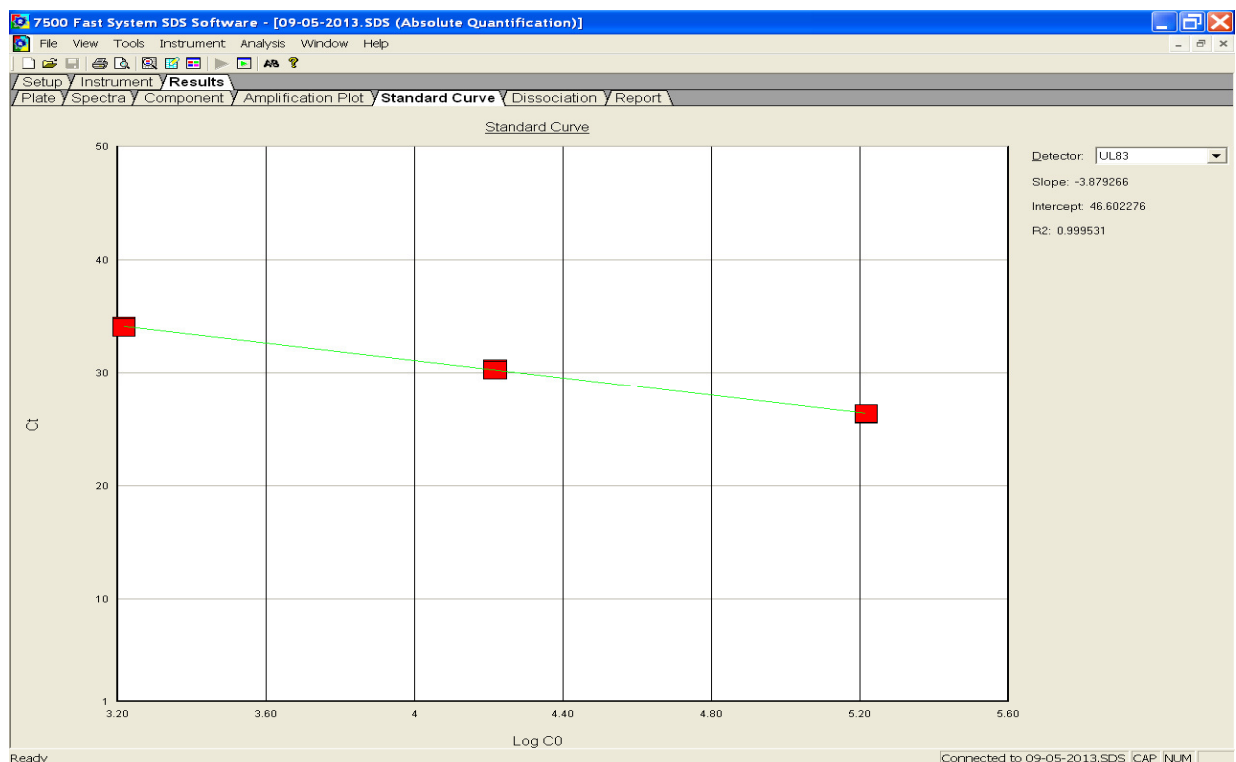
2.

File View Tools Instrument Analysis Window Help									
Setup Instrument Results									
Plate	Spectra	Component	Amplification Plot	Standard Curve	Dissociation	Report			
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	
B2	QS1	CMV	Standard	25.29	0.111	1.25e+006			
B3	QS1	CMV	Standard	25.45	0.111	1.25e+006			
B4	QS2	CMV	Standard	29.32	0.024	125000.00			
B5	QS2	CMV	Standard	29.36	0.024	125000.00			
B6	QS3	CMV	Standard	32.54	0.483	12500.00			
B7	QS3	CMV	Standard	33.23	0.483	12500.00			
B8	QS4	CMV	Standard	35.99	0.192	1250.00			
B9	QS4	CMV	Standard	36.26	0.192	1250.00			
B11	IC2W0	CMV	Unknown	Undet.					
B11	IC2W0	IC2 ARGENE	Unknown	30.02					
C2	AD 165000	CMV	Unknown	24.93	1.326	1.87e+006	1.22e+006	928612.532	
C3	AD 165000	CMV	Unknown	26.81	1.326	561085.06	1.22e+006	928612.532	
E2	1	CMV	Unknown	36.99		801.39			
E3	1A	CMV	Unknown	Undet.					
E4	1B	CMV	Unknown	Undet.					
E5	3	CMV	Unknown	Undet.					
E6	3C	CMV	Unknown	Undet.					
E7	3D	CMV	Unknown	Undet.					
E8	3E	CMV	Unknown	Undet.					
E9	4	CMV	Unknown	39.77		134.76			
E10	4A	CMV	Unknown	36.88		863.51			
E11	5	CMV	Unknown	Undet.					
F2	6	CMV	Unknown	Undet.					
F7	9A	CMV	Unknown	32.08		18818.37			
F8	9B	CMV	Unknown	36.00		1514.86			
F9	9C	CMV	Unknown	36.44		1144.90			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



2. Técnica in house

7500 Fast System SDS Software - [09-05-2013. SDS (Absolute Quantification)]									
File View Tools Instrument Analysis Window Help									
Setup Instrument Results									
Plate Spectra Component Amplification Plot Standard Curve Dissociation Report									
Well	Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Qty	Mean Qty	StdDev Qty	
B2	A	UL83	Standard	26.30	0.036	165000.00			
B3	A	UL83	Standard	26.35	0.036	165000.00			
B4	B	UL83	Standard	30.36	0.079	16500.00			
B5	B	UL83	Standard	30.25	0.079	16500.00			
B6	C	UL83	Standard	34.15	0.084	1650.00			
B7	C	UL83	Standard	34.03	0.084	1650.00			
C2	C3	UL83	Unknown	37.48	0.672	224.86	176.41	68.513	
C3	C3	UL83	Unknown	38.43	0.672	127.97	176.41	68.513	
C4	C4	UL83	Unknown	39.12	0.228	84.84	93.79	12.651	
C5	C4	UL83	Unknown	38.80	0.228	102.74	93.79	12.651	
C8	C Neg	UL83	Unknown	Undet.					
E5	15	UL83	Unknown	Undet.					
E6	15	UL83	Unknown	Undet.					
E7	C.I.	UL83	Unknown	31.51	4.078	7751.73	1.49e+006	4.69e+006	
E8	15A	UL83	Unknown	Undet.					
E9	15A	UL83	Unknown	Undet.					
E10	C.I.	UL83	Unknown	31.94	4.078	6007.24	1.49e+006	4.69e+006	
F2	15B	UL83	Unknown	Undet.					
F3	15B	UL83	Unknown	Undet.					
F4	C.I.	UL83	Unknown	31.54	4.078	7655.90	1.49e+006	4.69e+006	
F5	15C	UL83	Unknown	Undet.					
F6	15C	UL83	Unknown	38.67		110.83			
F7	C.I.	UL83	Unknown	31.99	4.078	5844.83	1.49e+006	4.69e+006	
F8	17	UL83	Unknown	Undet.					
F9	17	UL83	Unknown	Undet.					
F10	C.I.	UL83	Unknown	31.91	4.078	6142.97	1.49e+006	4.69e+006	
G2	17A	UL83	Unknown	34.81	0.004	1097.66	1099.32	2.350	
G3	17A	UL83	Unknown	34.80	0.004	1100.98	1099.32	2.350	
G4	C.I.	UL83	Unknown	31.43	4.078	8161.11	1.49e+006	4.69e+006	
G5	17B	UL83	Unknown	34.24	0.086	1540.17	1598.11	81.939	
G6	17B	UL83	Unknown	34.11	0.086	1656.05	1598.11	81.939	
G7	C.I.	UL83	Unknown	31.32	4.078	8680.64	1.49e+006	4.69e+006	



Anexo VII - Resultados obtidos pelas duas técnicas de PCR em tempo real.

Amostra	RT-PCR <i>in house</i>	Cópias de ADN de CMV por ml	RT-PCR CMV, HHV6,7,8 R-gene™	Cópias de ADN de CMV por ml
1	Negativa		Positiva	801,39
1A	Negativa		Negativa	
1B	Negativa		Negativa	
3	Negativa		Negativa	
3B	Positiva	63,79	Positiva	651,80
3C	Negativa		Negativa	
3D	Negativa		Negativa	
3E	Negativa		Negativa	
4	Negativa		Positiva	134,76
4A	Negativa		Positiva	863,51
5	Negativa		Negativa	
6	Negativa		Negativa	
8	Negativa		Negativa	
8A	Negativa		Negativa	
8B	Negativa		Negativa	
8C	Negativa		Negativa	
9	Positiva	30412,36	Positiva	96860,73
9A	Positiva	7922,98	Positiva	18818,37
9B	Positiva	822,98	Positiva	1514,86
9C	Positiva	763,32	Positiva	1144,90
10	Negativa		Negativa	
10A	Negativa		Negativa	
10B	Negativa		Negativa	
10C	Negativa		Negativa	
10D	Negativa		Negativa	
11	Negativa		Negativa	
11A	Negativa		Negativa	
12	Negativa		Negativa	
13	Negativa		Negativa	
13A	Negativa		Negativa	
14	Negativa		Negativa	
14A	Negativa		Negativa	
14B	Negativa	311,01	Positiva	1083,51
15	Negativa		Negativa	
15A	Negativa		Negativa	
15B	Negativa		Negativa	

15C	Negativa	110,83	Negativa	232,89
16	Negativa		Negativa	
17	Negativa		Negativa	
17A	Positiva	1099,32	Positiva	4688,19
17B	Positiva	1598,11	Positiva	4343,31
17C	Positiva	1967,73	Positiva	5423,46
18	Negativa		Negativa	
18A	Negativa		Negativa	
19	Negativa		Negativa	
19A	Negativa		Negativa	
19B	Negativa		Negativa	
19C	Negativa		Negativa	
19D	Positiva	275,45	Positiva	776,80
20	Negativa		Negativa	
20A	Negativa		Negativa	
20B	Negativa		Negativa	
20C	Negativa		Negativa	
21	Negativa		Positiva	354,95
21A	Positiva	934,34	Positiva	7196,50
22	Negativa		Negativa	
24	Negativa		Negativa	
24A	Negativa		Negativa	
24B	Negativa		Negativa	
25	Negativa		Negativa	
25A	Negativa		Negativa	
25B	Negativa		Negativa	
26	Negativa		Negativa	
27	Negativa		Negativa	
27A	Negativa		Negativa	

Anexo VIII – Valores da carga viral obtidos pela técnica in house ajustada

Amostra	Carga viral obtida pelo PCR em tempo Real in house ajustada
1	-
3 B	643,86
4	-
4 A	-
9	85345,48
9 A	21017,06
9 B	2819,09
9 C	1043,89
14 B	1750,52
15 C	514,94
17 A	2583,53
17 B	6319,98
17 C	6364,91
19 D	
21	-
21 A	2977,47

**Anexo IX – Concentração das citocinas nos doentes com processo
inflamatório.**

Doente	Semana	Carga viral	Citocinas								
			IL-1 α	IL-1 β	IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	INF- α	TNF α
1	E	801,39	<5,6	12,42	<0,7	<2,3	36,91	28,49	11,89	<10,5	22,165
3	E	-	<5,6	18,07	<0,7	3,01	238,5	27,94	15,64	<10,5	24,995
	1 ^a	651,80	<5,6	18,41	<0,7	2,93	642,7	65,81	59,92	12,76	35,99
	2 ^a	-	<5,6	20,53	<0,7	3,12	15,76	24,41	<4,9	<10,5	23,85
4	E	134,76	<5,6	21,74	<0,7	2,88	30,96	149,6	8,41	<10,5	12,145
	1 ^a	863,51	<5,6	19	<0,7	2,84	14,20	110,6	<4,9	<10,5	8,73
8	E	-	<5,6	15,89	<0,7	2,835	56,47	57,34	<4,9	<10,5	12,64
	2 ^a	-	<5,6	18,68	<0,7	2,73	14,16	9,96	<4,9	<10,5	10,86
10	E	-	<5,6	16,75	<0,7	2,995	29,53	232,5	8,845	<10,5	20,52
	2 ^a	-	<5,6	18,96	<0,7	2,67	7,42	94,54	5,52	<10,5	9,24
11	E	-	<5,6	16,05	<0,7	2,8	7,59	94,47	<4,9	<10,5	9,52
	2 ^a	-	<5,6	17,50	<0,7	2,735	7,505	94,50	4,98	<10,5	9,38
13	E	-	<5,6	20,14	<0,7	2,71	71,67	68,48	9,45	<10,5	21,65
	2 ^a	-	<5,6	20,3	<0,7	2,83	91,42	77,53	9,15	<10,5	22,37
14	E	-	<5,6	19,53	<0,7	2,74	244,5	47,94	9,965	<10,5	23,44
	2 ^a	-	<5,6	19,33	<0,7	2,85	79,24	248,5	15,3	<10,5	19,83
	3 ^a	1083,51	<5,6	19,7	<0,7	2,8	136,3	321,7	16,35	<10,5	20,22
15	E	-	<5,6	19,51	<0,7	2,825	107,7	285,1	15,82	<10,5	20,025
	2 ^a	-	<5,6	16,3	<0,7	3,12	27,24	156,9	5,99	<10,5	26,23
	4 ^a	232,89	<5,6	16,43	<0,7	2,76	27,58	151,7	<4,9	<10,5	24,74
17	E	-	<5,6	18,31	<0,7	2,86	184,4	140,8	7,335	<10,5	9,775
	2 ^a	4688,19	<5,6	17,24	<0,7	2,94	60,52	155,9	6,7	<10,5	11,33
	4 ^a	5423,46	<5,6	18,93	<0,7	2,8	96,48	170,3	7,61	<10,5	11,74
18	E	-	<5,6	18,08	<0,7	2,87	78,5	163,1	7,155	<10,5	11,535
	2 ^a	-	5,81	18,83	<0,7	3,08	137,7	350,5	8,41	<10,5	14,75
19	E	-	<5,6	58,16	<0,7	4,12	15,10	197,4	10,75	<10,5	56,535
	2 ^a	-	19,49	32,59	<0,7	3,11	101,2	179,7	10,4	<10,5	60,78
	3 ^a	-	14,7	25,75	<0,7	3,3	128,4	162,6	9,84	<10,5	57,29
	4 ^a	-	17,09	29,17	<0,7	3,205	114,8	171,1	10,12	<10,5	59,035
	5 ^a	776,8	<5,6	16,27	<0,7	2,78	10,42	71,07	9,09	14,78	22,64
20	E	-	<5,6	19,54	<0,7	2,845	116,7	83,61	5,81	<10,5	11,675
	2 ^a	-	<5,6	17,93	<0,7	3,3	31,32	79,43	7,73	<10,5	12,82
21	E	354,95	<5,6	18,08	<0,7	2,99	39,85	83,73	7,59	<10,5	15,99
	2 ^a	7196,50	<5,6	18,00	<0,7	3,145	35,58	81,58	7,66	<10,5	14,405
24	E	-	<5,6	16,71	<0,7	2,89	9,27	44,23	6,02	<10,5	14,95
	2 ^a	-	<5,6	18,3	<0,7	2,76	11,57	45,78	6,52	<10,5	10,22
25	E	-	<5,6	19,39	<0,7	2,745	30,34	41,21	14,24	<10,5	29,62
	2 ^a	-	<5,6	18,3	<0,7	3,3	23,17	35	<4,9	<10,5	11,66

E- Entrada, 1^a – Primeira Semana, 2^a – Segunda Semana, 3^a – Terceira Semana

Anexo X – Concentração das citocinas no grupo controlo

Doente	Citocinas (pg/ml)					
	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	TNF- α
1	1,00	0,20	5,72	15,81	5,81	1,40
2	1,00	0,20	5,29	6,97	3,69	0,70
3	16,21	0,20	0,60	8,92	7,36	19,56
4	1,00	0,20	6,28	16,55	0,30	0,70
5	1,00	0,20	5,68	9,09	0,30	5,81
6	2,00	0,20	6,23	18,13	7,65	19,78
7	1,00	0,20	6,46	12,21	4,49	13,02
8	1,00	0,20	7,49	13,14	5,74	0,70
9	1,00	0,20	0,30	8,72	0,30	0,70
10	15,93	0,20	0,60	11,45	5,53	1,40
11	1,00	0,10	0,30	11,74	0,30	0,70
12	1,00	0,10	0,30	17,01	0,30	0,70
13	1,00	0,10	0,60	12,73	5,73	1,40
14	2,00	0,10	0,30	8,69	0,15	0,70
15	1,00	0,10	0,30	6,95	0,15	0,70
16	1,00	0,10	0,30	13,94	0,30	0,70

Anexo XI - Concentrações das várias citocinas obtidas nas amostras de carga viral superior e inferior do doente

Correlations													
	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)	IL1menor	IL1maior	IL4menor	IL4maior	IL6menor	IL6maior	IL8menor	IL8maior	IL10menor	IL10maior	TNFMenor	TNFMaior
IL1menor		1											
			,987	,675	-,701	-,098	-,352	,519	-,209	,955	-,914	-,036	-,430
	N	3	,103	,528	,505	,937	,771	,653	,866	,191	,266	,977	,717
IL1maior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)		1	,785	-,577	,063	-,197	,650	-,049	,955	-,914	-,036	-,430
	N	3	3	,425	,608	,535	,914	,125	,606	,361	,369	,874	,279
IL4menor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)			1	,052	,668	,452	,981	,580	,200	-,702	-,761	,375
	N	3	3	3	,967	,535	,701	,410	,994	,872	,504	,085	,755
IL4maior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)				1	,778	,914	,617	,844	-,060	-,127	-,687	,945
	N	3	3	3	3	,432	,265	,800	,361	,996	,462	,991	,212
IL6menor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)					1	,966	,410	,994	,200	-,702	-,761	,375
	N	3	3	3	3	3	,167	,410	,994	,200	-,702	-,761	,375
IL6maior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)						1	,617	,889	-,060	-,127	-,687	,945
	N	3	3	3	3	3	3	3	,095	,962	,504	,085	,212
IL8menor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)							1	,727	,748	-,127	-,970	,941
	N	3	3	3	3	3	3	3	,481	,462	,919	,157	,221
IL8maior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)								1	,089	,588	-,970	,996
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	,943	,599	,373	,054
IL10menor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)									1	-,753	-,330	,966
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,457	,786	,212
IL10maior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)										1	-,373	,945
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,756	,450
TNFMenor	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)											1	-,887
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	,306
TNFMaior	Pearson Correlation Sig. (2-tailed)												1
	N	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3